



**Vermeidung von Viruserkrankungen (Möhrenröte)
im Ökologischen Möhrenanbau:
a) Status Quo Analysen, b) Entwicklung eines
Virusnachweises und c) Erarbeitung von Strategien
zur Lösung bestehender Probleme im Ökologischen
Landbau**

Erstellt von:

Universität Kassel
Fachgebiet Ökologischer Pflanzenschutz
Nordbahnhofstraße 1a, 37213 Witzenhausen
Tel.: +49 5542 98-1559
E-Mail: hsaucke@wiz.uni-kassel.de
Internet: <http://cms.uni-kassel.de/>

Gefördert vom Bundesministerium
für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Bundesprogramm ökologischer Landbau

Förderkennzeichen: 02OE253

Abschlußbericht

15.10.2002 bis 31.01.2004

„Vermeidung von Viruserkrankungen (Möhrenröte) im ökologischen Möhrenanbau:

- a) Status Quo Analysen,
- b) Entwicklung eines Virusnachweises und
- c) Erarbeitung von Strategien zur Lösung bestehender Probleme im ökologischen Landbau“

Ausführende Stelle:

- **Universität Kassel**

Dr. Helmut Saucke, Dipl. Ing. agr. Susanne Fittje
Fachbereich 11, Ökologische Agrarwissenschaften
Fachgebiet Ökologischer Pflanzenschutz
Nordbahnhofstraße 1a
37213 Witzenhausen

Projektbeteiligte:

- **Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft**

Dr. Heinrich-Josef Vetten, Dr. Wulf Menzel
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und
biologische Sicherheit
Messeweg 11/12
38104 Braunschweig

- **Kompetenzzentrum Ökolandbau Niedersachsen GmbH**

Dipl. Ing. agr. Florian Rau, Dipl. Ing. agr. Holger Buck
Bahnhofstraße 15
27374 Visselhövede

- **Deutsche Sammlung f. Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH (DSMZ)**

Dr. S. Winter
Abteilung Pflanzenvirologie
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig



Inhaltsverzeichnis

1	Ziele des Projektes, Darstellung des mit der Fragestellung verbundenen Entscheidungshilfe-/Beratungsbedarfs im BMVEL.....	10
1.1	Planung und Ablauf des Projektes.....	11
1.1.1	TP 1: Entwicklung eines ELISA-Testkit & PCR-Nachweises.....	11
1.1.2	TP 2: Survey.....	12
1.1.3	TP 3: Sortenwahl & Saattermin.....	12
1.1.4	TP 4: Ergebnisaufbereitung, Öffentlichkeitsarbeit.....	12
1.2	Vernetzung der Arbeitsgruppen im Gesamtprojekt.....	12
1.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	13
1.3.1	CMD-Virus- und Vektorbiologie.....	13
1.3.2	Erfordernis Virusnachweis.....	13
1.3.3	Lösungsansätze zur Regulation.....	14
1.3.3.1	Koinzidenzvermeidung (Saatzeitpunkt).....	14
1.3.3.2	Sortenwahl & Reifetyp.....	14
1.3.3.3	Infektionsquelle Nebenwirte & Samenträger.....	14
2	Material und Methoden Arbeitsgruppe A: Entwicklung eines Virusnachweises	16
2.1	Verwendetes Pflanzenmaterial.....	16
2.2	Gesamtnukleinsäureextraktion mit Silica-Partikeln.....	16
2.3	RNA-Extraktion mit dem Nucleo Spin RNA Plant Kit (Macherey und Nagel).....	16
2.4	Extraktion von doppelsträngiger RNA (dsRNA).....	16
2.5	Natriumacetat-Ethanol Fällung.....	16
2.6	rPCR.....	17
2.7	Bestimmung von extremen 3'-Ende viraler RNA.....	18
2.8	Viruspezifische Primer.....	19
2.9	cDNA-Synthese.....	19
2.10	Standard-PCR.....	20
2.11	Gelelektrophorese.....	20
2.12	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen.....	21
2.13	Vektor-Herstellung und -Ligation.....	21
2.14	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	22
2.15	Selektion transformierter Zellen.....	22
2.16	Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA für die Auftragssequenzierung.....	23
2.17	Sequenzauswertung.....	23
2.18	Erstellung von Dauerkulturen.....	23
2.19	Elektronenmikroskopie.....	23
2.20	Kultur von Pflanzen im Gewächshaus.....	24
2.21	Übertragungsversuche.....	24
2.22	Expression viraler Proteine.....	25
2.23	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.24	Reinigung des CtRLV.....	26
2.25	Gewinnung von Antiseren.....	26
3	Ergebnisse der Arbeitsgruppe A: Entwicklung eines Virusnachweises	27
3.1	Carrot red leaf virus.....	27
3.2	Carrot mottle mimic virus / Carrot mottle virus.....	31
3.3	Carrot thin leaf virus.....	34
3.4	Carrot yellow leaf virus.....	34
3.5	Parsnip yellow fleck virus.....	38
3.6	„Beny“-Virus.....	38
3.7	Carlavirus.....	40
3.8	dsRNA-Viren.....	43
4	Material und Methoden Arbeitsgruppe B: Status Quo Analysen, Strategien und Lösungsansätze.....	44
4.1	Versuchsaufbau.....	44
4.1.1	Standort Hassel 2002, 2003.....	44
4.1.2	Standort Hebenshausen 2003.....	46
4.2	Datenerhebung.....	47
4.2.1	Bonituren der Haupt- und Nebenwirte auf Cavariella- und Virusbesatz.....	47

4.2.2	Blattlausbonituren an Möhrenpflanzen	47
4.2.3	Erfassung der Blattlaus-Flugaktivität mittels Gelbschalen	48
4.2.4	Survey 2003	48
4.2.5	Umfragen, Einsendung von Möhrenproben	48
4.2.6	Bestandes- und Symptomentwicklung	48
4.2.7	Qualitätsuntersuchungen	49
5	Ergebnisse Arbeitsgruppe B: Status Quo Analysen, Strategien und Lösungsansätze	50
5.1	Versuchsverlauf	50
5.1.1	Beschreibung der aufgetretenen Symptome	50
5.1.2	<i>C. aegopodii</i> und Virusbesatz an Haupt- und Nebenwirten	51
5.1.3	Relative Lage der Schläge und Nebenwirtrefugien	51
5.2	Feld und Gewächshausversuche (Universität Kassel)	53
5.2.1	Feldversuch Hassel 2002 und 2003	53
5.2.1.1	Blattlausflugverlauf	53
5.2.1.2	Blattläuse im Bestand	53
5.2.1.3	Einfluss von Netz- und Vliesabdeckungen auf die Symptomentwicklung	54
5.2.1.4	Symptomausprägung im Vegetationsverlauf	55
5.2.1.5	<i>Alternaria spp.</i>	55
5.2.1.6	Qualitätsparameter	55
5.2.2	Feldversuch Hebenshausen	56
5.2.2.1	Blattlausflugverlauf	56
5.2.2.2	Blattläuse im Bestand	57
5.2.2.3	Einfluss von Saatzeitpunkt und Vliesabdeckung auf die Symptomentwicklung	57
5.2.2.4	Künstliche Inokulation von Jungpflanzen	57
5.2.2.5	<i>Alternaria spp.</i>	58
5.2.2.6	Qualitätsparameter	58
5.2.2.7	Erträge und Sortierungen	59
6	Survey	60
6.1.1	Charakterisierung der Hauptproblemregion Niedersachsen	60
6.1.1.1	Geographische Lage betroffener Betriebe	60
6.1.1.2	Möhren-Anbauintensität betroffener Betriebe	60
6.1.1.3	Symptomentwicklung im Vegetationsverlauf	61
6.1.1.4	Ernteverluste auf Praxisbetrieben	62
6.1.1.5	Qualitätsparameter	62
6.1.2	Bundesweite Umfrage zu betroffenen Anbauregionen	63
6.2	Ergebnisse der Virusanalytik	66
6.2.1	Symptomatik und Infektionsstatus in der Hauptproblemregion Niedersachsen	66
6.2.1.1	Virusbefunde im Survey Niedersachsen	66
6.2.1.2	Virusbefunde in Hassel und Hebenshausen	67
6.2.1.3	Virusbefunde von Einsendungen aus dem Bundesgebiet	69
7	Diskussion der Ergebnisse	70
7.1	Entwicklung eines Virusnachweises	70
7.2	Symptomatik	71
7.3	Ernteverluste auf Praxisbetrieben und Qualitätsparameter	71
7.3.1	Anfälligkeit von Verarbeitungs- und Frischmarktsorten	71
7.4	Status von <i>C. aegopodii</i> als potentieller Vektor	72
8	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den Ökologischen Landbau; Möglichkeiten der Umsetzung	72
9	Zusammenfassung	74
10	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	75
10.1	Arbeitsgruppe A: Virusanalyse	75
10.2	Arbeitsgruppe B: Status Quo und Lösungsansätze zur Regulation	76
11	Weiterführende Fragestellungen	78
12	Literaturverzeichnis	80
13	Danksagung	83

14	Anhang.....	84
14.1	Sequenzierungsergebnisse der Viren	84
14.1.1	Carrot red leaf virus:	84
14.1.1.1	CtRLV CP Hassel aus Möhre	84
14.1.1.2	CtRLV CP Californien aus Möhre	84
14.1.1.3	CtRLV CP Aschersleben aus Dill	84
14.1.1.4	CtRLV CP BBA Braunschweig aus Kümmel	84
14.1.1.5	CtRLV CP BBA Braunschweig aus Riesenbärenklau	84
14.1.1.6	CtRLV CP Löhne aus Möhre	84
14.1.1.7	CtRLV BBA Braunschweig aus Petersilie	85
14.1.1.8	CtRLV Hebenshausen aus Möhre	85
14.1.1.9	CtRLV Weddel aus Petersilie	85
14.1.1.10	CtRLV RdRp Großbritannien aus Möhre Accession AAQ00930	85
14.1.1.11	CtRLV RdRp Großbritannien aus Möhre Accession AX404765	85
14.1.1.1.12	CtRLV RdRp Aschersleben aus Dill	86
14.1.1.1.13	CtRLV RdRp Hassel aus Möhre.....	86
14.1.1.1.14	CtRLV RdRp Kiel aus Möhre	86
14.1.1.1.15	CtRLV RdRp BBA Braunschweig aus Petersilie	86
14.1.2	Carrot mottle mimic virus:	86
14.1.2.1	CMoMV Bingenheim	86
14.1.2.2	CMoMV Californien	86
14.1.3	Carrot yellow leaf virus:	86
14.1.3.1	CYLV Bingenheim.....	86
14.1.3.2	CYLV CP Hebenshausen	87
14.1.4	Parsnip yellow fleck virus:	87
14.1.4.1	PYFV Sequenz 1	87
14.1.4.2	PYFV Sequenz 2	87
14.1.5	Carrot thin leaf virus:.....	87
14.1.6	Benyvirus:	88
14.1.7	Carlavirus:	88
14.1.7.1	>Carla Bingenheim	88
14.1.7.2	>Carla Braunschweig	88
14.1.8	dsRNA-Viren:	89
14.1.8.1	dsRNA-Virus I.....	89
14.1.8.2	dsRNA-Virus II	89
14.1.8.3	dsRNA-Virus III	89
14.2	Klimatische Rahmenbedingungen	90
14.2.1.1	Standort Hassel	90
14.2.1.2	Standort Hebenshausen	90
14.3	Symptomverlauf markierter Pflanzen in Hebenshausen	91
14.3.1	Standort Hassel	91
14.3.2	Standort Hebenshausen	96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Bestand mit stark symptomtragenden Verarbeitungsmöhren (180 Tage Sorte, rechts) neben Frischmarktmöhren (120 Tage Sorte, links); Hassel (2000).	10
Abb. 2:	Ähnlichkeit der Hüllproteinsequenzen verschiedener Isolate des CtRLV.	28
Abb. 3:	Aminosäuresequenzähnlichkeit der RdRps verschiedener Isolate des CtRLV.	29
Abb. 4:	Ähnlichkeit der Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren der Familie <i>Luteoviridae</i> im Vergleich mit den neu ermittelten CtRLV-Sequenzen.	30
Abb. 5:	Gelelektrophoretische Auftrennung repräsentativer PCR-Produkte positiver Proben (M: Größenstandard, 1-7: CtRLV, „Beny“-Virus, CMoMV, CYLV, PYFV, Carlavirus, CTLV).	31
Abb. 6:	Genkarte des CMoMV	32
Abb. 7:	Aminosäuresequenzähnlichkeit im RdRp verschiedener Viren der Gattung <i>Umbravirus</i> im Vergleich mit den neu ermittelten Sequenzen der CMoMV/CMoV-Isolate.	33
Abb. 8:	Genkarte des CYLV in Anlehnung an das BYV	35
Abb. 9:	Phylogenetischer Baum des HSP70-Proteins der Viren der Familie <i>Closteroviridae</i>	36
Abb. 10:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CYLV-Partikeln	37
Abb. 11:	Genomorganisation des neuen Möhrenvirus im Vergleich zu Beny- und Hepeviren	39
Abb. 12:	Sequenzvergleich der RdRps verschiedener Viren der Gattungen <i>Benyvirus</i> , <i>Hepevirus</i> , der Familie <i>Togaviridae</i> und des neuen Virus aus Möhre („Beny“-Virus)	40
Abb. 13:	Organisation der 3'-Hälfte des Genoms des neuen Carlavirus	41
Abb. 14:	Aminosäuresequenzähnlichkeiten in den Hüllproteinen verschiedener Viren der Gattung <i>Carlavirus</i> im Vergleich mit dem neuen Carlavirus aus Möhre:	42
Abb. 16:	Versuchsplan Hassel 2002	45
Abb. 17:	Versuchsplan Hassel 2003	45
Abb. 18:	Versuchsplan Hebenshausen 2003	46
Abb. 19:	Rot- bis Gelbfärbung des Laubes in oberen Blattetagen	50
Abb. 20:	Kümmerswuchs der Herzblätter mit absterbenden älteren Laubblättern	50
Abb. 21:	Verschiedene Ausprägungen von Wurzelbärten und sog. „Rattenschwänzen“	50
Abb. 22:	Kerbel mit leichter Rotfärbung der unteren Blattpartien	51
Abb. 23:	Regionale Möhrenanbaudichte, sowie Haupt- und Nebenwirte von <i>C. aegopodii</i> (Hassel 2002)	52
Abb. 24:	Regionale Möhrenanbaudichte, sowie Haupt- und Nebenwirte von <i>C. aegopodii</i> (Hassel 2003)	52
Abb. 25:	Gelbschalenfänge der Jahre 2002 und 2003 am Standort Hassel	53
Abb. 26:	Anzahl symptomtragender Pflanzen in Abhängigkeit der Vliesaufdeckung am Standort Hassel in den Jahren 2002	54
Abb. 27:	Anzahl blatt-symptomtragender Pflanzen in den Sorten Kameran, Bolero und Nebula zu unterschiedlichen Terminen am Standort Hassel im Jahr 2003	55
Abb. 28:	Gelbschalenfänge in den Jahren 2002 und 2003 am Standort Hebenshausen.	56
Abb. 32:	Lage der im Survey beprobten Praxisflächen in der niedersächsischen Haupt-Problemregion	60
Abb. 33:	Symptomentwicklung (Blattsymptome) auf niedersächsischen Praxisbetrieben 2003.	61
Abb. 34:	Probenahme auf dem Praxisschlag Neuenkirchen, 17.09.03	62
Abb. 35:	Kalkulatorischer Ertragsausfall in Beziehung zum Anteil symptomtragender Pflanzen im Bestand	62
Abb. 36:	Herkunftsregionen und Virusbefunde in den eingesendeten Möhrenproben 2003	69
Abb. 37:	Tagesmittel und Niederschlag der Messstationen Bremen Flughafen und Verden Dauelsen	90
Abb. 38:	Tagesmittel und Niederschlag der Messstationen Göttingen und Witzenhausen Ziegenhagen	90

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Anbaumaßnahmen an den Standorten Hassel 2002 und 2003 und Hebenshausen 2003	44
Tab. 2:	Termine der Feldbeprobungen am Standort Hassel 2003	46
Tab. 3:	Termine der Feldbeprobungen am Standort Hebenshausen	47
Tab. 4:	Durchgeführte Verfahren zur Bestimmung der Qualitätsparameter der Erntemöhren	49
Tab. 5:	Relativ- und Mittelwerte der Mineralstoffgehalte der Möhrensorten am Standort Hassel 2003.	55
Tab. 6:	Mittelwerte der Nitrat- u. Zuckergehalte der Möhrensorten am Standort Hassel 2003.	56
Tab. 7:	Mineralstoffgehalte früher und später Saattermine der Sorten Bolero und Kameran am Standort Hebenshausen 2003.	58
Tab. 8:	Nitrat und Zuckergehalte früher und später Saattermine der Sorten Bolero und Kameran am Standort Hebenshausen 2003	58
Tab. 9:	Möhrenanbauintensität und Spezialisierungsgrad niedersächsischer Betriebe 2003.	61
Tab. 10:	Mineralstoffgehalte symptomtragender und symptomloser Möhren von 5 Standorten in Niedersachsen.	63
Tab. 11:	Nitrat und Zuckergehalte symptomtragender und symptomloser Möhren im Vergleich von 5 Standorten in Niedersachsen.	63
Tab. 12:	Einsendungen symptomtragender Möhren, bundesweite Umfrage 2003	64
Tab. 13:	PCR-Befunde für CtRLV und CMoV/CMoMV in Möhrenproben der 5 Betriebe in Niedersachsen 2003	66
Tab. 14:	Symptomatik und Infektionsstatus von Möhren der Praxisbetriebe in Niedersachsen 2003	67
Tab. 15:	Symptomatik und Infektionsstatus de Versuchsstandorte Hassel und Hebenshausen 2003.	68
Tab. 16:	Zeithorizont, Zielerreichungsgrad und Modifikation im Projektablauf	77
Tab. 17:	Lufttemperatur und Niederschlag im Jahr 2003 im Vergleich zum langjährigen Mittel.	91

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
BBA	Biologische Bundesanstalt
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl	Chlor
CMD	Carrot motley dwarf
CMoMV	Carrot mottle mimic virus
CMoV	Carrot mottle virus
CTLV	Carrot thin leaf virus
CtRLV	Carrot red leaf virus
CYLV	Carrot yellow leaf virus
dkl.	dunkel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
dscDNA	doppelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung f. Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
dt	Dezitonne
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Gramm
h	Stunden
ha	Hektar
K	Kalium
kg	Kilogramm
KÖN	Kompetenzzentrum Ökolandbau Niedersachsen GmbH
m	Meter
M	Mol
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
MP	Transportprotein
MW	Mittelwert

n.u.	nicht untersucht
Na	Natrium
NABP	Nukleinsäure-bindendes Protein
n.b.	Nicht bekannt
NO ₃	Nitrat-Stickstoff
nt	Nukleotide
ORF	Offener Leserahmen
P	Phosphor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Polyetylen
ppm	parts per million, 1.000.000 Gramm
PYFV	Parsley yellow fleck virus
RdRp	RNA abhängige RNA Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rPCR	random Polymerase Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
s	Standardfehler
S	Schwefel
sek	Sekunden
SL	symptomlos
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
ST	symptomtragend
Tab.	Tabelle
TGB	Triple-Gene-Block
TP	Teilprojekt
TS	Trockensubstanz
U	Einheiten
z.B.	zum Beispiel
λ	Lambda
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromol

1 Ziele des Projektes, Darstellung des mit der Fragestellung verbundenen Entscheidungshilfe-/Beratungsbedarfs im BMVEL

Die Möhre kann als wichtigste Gemüsekultur des Ökologischen Landbaus gelten. Fruchtfolgeanteile von 15% und regional auch mehr, werden in den Hauptanbaugebieten Niedersachsens und Nordrhein-Westfalens erreicht, wo Möhren als Schwachzehrer, besonders in den Regionen mit leichten und humosen Böden, erwünscht niedrige Nitratwerte bei gleichzeitig leichter maschineller Beerntbarkeit im Herbst gewährleisten. Diese hohe Attraktivität von „Bio“-Möhren ist auf die gute Eignung für den Vertragsanbau mit Herstellern für Babynahrung wie Hipp, Biopolis und anderen Großabnehmern zurückzuführen. Zusätzlich kompletieren Frischmarktmöhren die Vermarktungsmöglichkeiten. Folglich konnte in den letzten Jahren eine stetig steigende Nachfrage seitens der Verbraucher festgestellt werden (Ökoring Niedersachsen 2004). Eine Ausweikkultur mit ähnlich günstigen Eigenschaften steht Landwirten dieser Schwerpunktgebiete nicht zur Verfügung.

Die Wirtschaftlichkeit des Möhrenanbaus erscheint seit jüngerer Zeit durch das wiederholte Auftreten einer virusverdächtigen Erkrankung, die aufgrund auffälliger Verfärbungen der Laubblätter in der landwirtschaftlichen Praxis meist als „Möhrenröte“ bezeichnet wird (vergl. Abb. 1), gefährdet zu sein. Das in mehreren Jahren massive Auftreten symptomtragender Pflanzen, deren Rübenkörper sich durch dünne, biegbare Rübenkörper sog. „Rattenschwanzigkeit“ und Minderertrag auszeichnen, war der Hauptgrund dafür, dass verschiedene sowohl ökologisch als auch konventionell wirtschaftende Betriebe in Niedersachsen die Produktion von Industriemöhren gänzlich aufgaben (Rau, 2001).



Abb. 1: Bestand mit stark symptomtragenden Verarbeitungsmöhren (180 Tage Sorte, rechts) neben Frischmarktmöhren (120 Tage Sorte, links); Hassel (2000).

Über die Identität der Schaderreger sowie die Ursachen, die zu dieser in den Anbaugebieten neuen Symptomatik führten, herrschte seitens der Officialberatung Unklarheit, so dass die

drängenden Fragen betroffener Landwirte weder beantwortet noch praxisrelevanten Empfehlungen ausgesprochen werden konnten. Aus dem in 2002 von der Landwirtschaftskammer Hannover finanzierten Kooperationsvorhaben zwischen dem Ökoring Niedersachsen und der Universität Kassel (Schmiegel 2002, Rau & Buck 2003) konnten wesentliche Vorarbeiten und Ergebnisse in den hier vorgestellten Projektbericht einfließen.

Einen weiteren klärungsbedürftigen Problembereich für die landwirtschaftliche Praxis bildete die ökologische Vermehrung von Möhrensaatgut. Wiederholte Meldungen erhöhter Ausfälle in Samenträgerbeständen (Bingenheimer Saatgut AG, Dreschflegel e.V., Schönhagen), die ebenfalls mit Viruserkrankungen in Verbindung gebracht wurden (Ullrich, pers. Mitt. 2001), konnten mit der zur Verfügung stehenden Analytik ursächlich nicht aufgeklärt werden.

Nach eingehender Prüfung möglicher Ursachen für die vorliegende Symptomatik (Ernährungsstörungen u.a.), erschien nach Literaturlage eine virusbedingte Erkrankung am wahrscheinlichsten zu sein. Bei der favorisierten Erkrankung „Möhrenröte“, die auch als „Möhrenscheckung“ (Crüger et al. 2002) bezeichnet wird, handelt es sich um eine Mischinfektion zweier Viren, dem Möhrenrotblattvirus (*Carrot red leaf virus [CtRLV]; Luteoviridae*) und dem Möhrenscheckungsvirus (*Carrot mottle umbravirus [CMoV]*) (Stubbs 1948). Da die beiden Viren meist in Mischinfektion auftreten, wird die Krankheit in der englischsprachigen Literatur zusammenfassend als Carrot motley dwarf (CMD) bezeichnet (Koike et al. 2002). Für die nicht samenbürtige Krankheit gilt die Gierschblattlaus *Cavariella aegopodii* als Hauptvektor (Stubbs 1948). Die unbeabsichtigte Einschleppung des CMD-Vektors hatte z.B. in Australien und Neuseeland zu katastrophalen Ertragseinbrüchen geführt. Die beschriebenen Symptome dieser Autoren (Stubbs 1948; Smith 1960), sowie Meldungen aus Grossbritannien Watson et al., 1964 und den Niederlanden (van Dijk & Bos 1985) waren denen in Niedersachsen ähnlich, d.h. rötliche Verfärbungen des Laubes mit „rattenschwänzigen“ Rübenkörpern und starker Seitenbewurzelung – („Bärtigkeit“). Allerdings konnte für das Probenmaterial der Befallsjahre 2002 & 2003 mit dem verfügbaren Test-Serum einer kalifornischen Arbeitsgruppe kein eindeutiger CtRLVCMD-Nachweis erbracht werden.

Das wichtigste Ziel des Projektes bildete deshalb die Identifizierung der Symptomursache(n) und die Bereitstellung einer brauchbaren und kostengünstigen Nachweismöglichkeit. Parallel zu den Identifizierungsarbeiten und der Diagnostikentwicklung wurden im Rahmen einer bundesweiten Status-Quo-Analyse Problemgebiete identifiziert und Materialproben von Praxischlägen für Analysen bereitgestellt. Gleichzeitig wurden in Parzellenversuchen unter Feldbedingungen zwei aussichtsreiche Lösungsansätze für den Umgang mit blattlausübertragenen Viruserkrankungen – Sortenwahl und frühe/späte Saatzeitpunkte - verfolgt. Die Zusammenführung der Arbeitsschwerpunkte sollte die notwendige Grundlage für eine tragfähige Strategieplanung und schließlich praxisrelevante Empfehlungen zum Umgang mit der Problematik liefern.

1.1 Planung und Ablauf des Projektes

Das Forschungsvorhaben lässt sich in vier Teilprojekte (TP) gliedern, wie folgt:

1.1.1 TP 1: Entwicklung eines ELISA-Testkit & PCR-Nachweises

Bei der Identifizierung von Pflanzenviren mittels serologischem Nachweis (ELISA) spielt die Gewinnung des viralen Hüllproteins als Antigen die zentrale Rolle. Hierfür wurden zwei mögliche, im Methodenteil unter Pkt. 2.4 und Pkt. 2.22 beschriebene Wege beschritten. Entsprechend aufbereitete Proben (gereinigte Viruspartikel oder bakteriell exprimiertes Virus-hüllprotein) sollten zur Produktion von Antiseren verwendet werden, welche dann als

„ELISA-Testkit“ zur Massentestung von Feldproben zur Verfügung stehen, um dem bestehenden Diagnosedefizit für Forschung und Pflanzenschutzberatung nachzukommen. Als alternative, aber für Massentestungen teurere Nachweismethode, sollten aus den isolierten viralen RNA-Bereichen spezifische Markersequenzen für nukleinsäurebasierende PCR-Nachweise eingesetzt werden.

1.1.2 TP 2: Survey

In den Problemgebieten sollte eine Bestandsaufnahme (Status-Quo-Analyse) zu den wichtigen Möhrenkrankheiten und Schädlingen erfolgen. Zusätzlich wurde eine bundesweite Befragungsaktion ökologischer Gemüsebaubetriebe zur Virussyptomatik in Möhren über die Berater der jew. Verbände organisiert.

Unter dem Aspekt blattlausübertragener Viruskrankheiten sollten exemplarisch in der „hot-spot-Region“ Hassel/Eystrup Daten zur Anbauintensität (relativen Schlagdistanzen) und zum Vorhandensein potentieller Nebenwirte in der Begleitvegetation für den Vektor Gierschblattlaus und Möhrenviren erhoben werden, da diese oft einen weiten Wirtskreis haben, welcher kultivierte Apiaceen als auch in der Begleitvegetation reichlich vorhandene Wildformen einschliesst (van Dijk & Bos 1989).

1.1.3 TP 3: Sortenwahl & Saattermin

Konkreten Beobachtungen aus der Praxis und Beratung folgend, sollte die offenbar unterschiedliche Anfälligkeit von Frischmarkt- und Verarbeitungsmöhren im Parzellenversuch überprüft werden. Weiterhin, aufbauend auf einer bereits in England und Neuseeland erfolgreich praktizierten Koinzidenzvermeidungsstrategie bezüglich des saisonalen Vektorfluges, sollte hier der Ansatz der sehr frühen bzw. späteren Saat sowohl auf Praxisschlägen als auch im Parzellenversuch verfolgt werden.

1.1.4 TP 4: Ergebnisaufbereitung, Öffentlichkeitsarbeit

Die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse wurden im Rahmen einer Informationsveranstaltung, zu der das KÖN-Visselhövede am 27.01.2004 Praktiker, Berater und Züchter einlud, vorgestellt. Der gegenwärtige Sachstand der Problematik und daraus abzuleitende praxisrelevante Empfehlungen wurden diskutiert.

1.2 Vernetzung der Arbeitsgruppen im Gesamtprojekt

Der Universität Kassel oblag die Projektkoordination und –verwaltung. Über Unterverträge waren die BBA Braunschweig, die DSMZ (Deutsche Sammlung f. Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH) und der Ökoring Niedersachsen im Projekt eingebunden. Aus den Aufgabenstellungen der Teilprojekte ergaben sich für die vier beteiligten Projektpartner zwei parallel und vernetzt arbeitende Arbeitsgruppen A & B:

Arbeitsgruppe A: Entwicklung von Virusnachweisen

Am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der BBA Braunschweig wurde die Virusanalytik (TP 1) mit unterschiedlichen Verfahren (mittels PCR und Elektronenmikroskop) angegangen, Markersequenzen entschlüsselt, mittels Datenbankvergleich (BLAST) systematisch eingeordnet, Übertragungsversuche mit Blattläusen durchgeführt und entsprechende Antiseren hergestellt. In Braunschweig lief sämtliches Probenmaterial zusammen und wurde auf das Vorliegen von Virussequenzen getestet. Der DSMZ in Braun-

schweig kam die Entwicklung marktfähiger ELISA-Testkits für die aufbereiteten Antigene zu. Mittlerweile konnten für das Carrot yellow leaf virus (CYLV, Closterovirus) und Carrot thin leaf virus (CTLV, Potyvirus) Antiseren hergestellt werden.

Arbeitsgruppe B: Status-Quo-Analysen, Strategien und Lösungsansätze

Die Teilprojekte 2, 3, & 4 wurden von der Universität Kassel in enger Zusammenarbeit mit dem Ökoring Niedersachsen durchgeführt. Dies beinhaltete die Anlage, Betreuung und Auswertung der Parzellen- und Freilandversuche, sowie die Materialzulieferungen von Praxisflächen aus Surveys für die Virusanalysen an der BBA Braunschweig. Der Ökoring Niedersachsen gewährleistete die Präsenz an Praxisschlägen zur Überwachung der Symptomenwicklung in der Hauptproblemregion Niedersachsen, stellte die Kontakte zu den betroffenen Landwirten her und koordinierte zusätzlich die bundesweite Beraterumfrage zur Befallssituation in Möhren. Der Universität Kassel oblag die Projektleitung, die Koordination der Arbeitsgruppen, die Zusammenführung der Teilergebnisse und die Abfassung des Endberichtes.

1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.3.1 CMD-Virus- und Vektorbiologie

Zu Projektbeginn konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem von (Rau 2001) beschriebenen Befallsbild in Niedersachsen aller Wahrscheinlichkeit nach um die Virose Carrot motley dwarf (CMD) (Möhrenröte oder Möhrenscheckung) handelte (Koike et al. 2002; Crüger et al. 2002). Der nicht samenübertragbare Viruskomplex (vergl. Pkt. 1 S. 10) wird persistent von der Gierschblattlaus *Cavariella aegopodii* übertragen (Stubbs, 1948, Dunn, 1965). Diese Art ist wirtswechselnd, als Winterwirt werden Weidenbäume besiedelt. Bereits ab Mitte Februar kann bei milder Witterung der Schlupf der Läuse aus den Winteriern beginnen, die bis dahin als virusfrei einzustufen sind (Watson et al., 1964). Bereits nach drei Generationen können geflügelte Nachkommen den Winterwirt verlassen (Kundu et al., 1993) und auf zweijährige Doldenblütler der Begleitflora wie Wilde Möhre (*Daucus carota*), Giersch (*Aegopodium podagraria*), Kälberkropf-Arten (*Chaerophyllum bulbosum* u.a.), Wiesenkerbel (*Anthriscus sylvestris*) und Bärenklau-Arten (*Hieracleum spondyleum* u.a.) und Kulturformen, wie z.B. Sellerie (*Apium graveolens*), Dill (*Anethum graveolens*), und Petersilie (*Petroselinum* sp.) (Dunn et al., 1966) überwechseln. Deshalb gelten als eigentliches Reservoir für die Neuinfektion der Möhrenbestände Umbelliferen der Begleitvegetation (Watson et al., 1964), bzw. Samenträgerbestände von Kulturmöhren in der näheren Umgebung.

Folglich lag ein wichtiger Schwerpunkt auf der Erhebung von Daten zur Phänologie des Hauptvektors und der Rolle potentieller Nebenwirte (vergl. 1.3.3.3., S. 14)

1.3.2 Erfordernis Virusnachweis

CMD resultiert aus einer vom CtRLV und CMoV verursachten Mischinfektion. CMoV tritt fast immer zusammen mit CtRLV auf, da CMoV keine eigene Virushülle bildet und nur in der Proteinhülle des CtRLV durch die Gierschblattlaus übertragen werden kann. Für die Identifizierung des CMoV (=partikkelloses Virus) ist in Belgien eine Nukleinsäuretechnik (PCR) (Vercruysse et al. 2000) und für CtRLV in den USA ein serologisches (DAS-ELISA) Nachweisverfahren (Watson & Falk 1994) beschrieben worden. Mit der PCR-Methode und mit den aus den USA erhaltenen Antikörpern gestaltete sich der Nachweis des CMoV bzw. CtRLV jedoch in eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Vetten als sehr unsicher und lieferte über die Vegetationsperioden 2000/01 keine verwertbaren Ergebnisse. Daraus ergab sich Forschungs-

bedarf zur molekularen Charakterisierung von bestimmten Teilen des CtRLV- und CMoV-Genoms sowie zur Herstellung eines „ELISA-fähigen“ Antiserums zum sicheren Nachweis des CtRLV. Für letzteres sollten sowohl konventionelle (Reinigung von Viruspartikeln) als auch molekularbiologische (bakterielle Expression des Hüllproteingens) Methoden eingesetzt werden. Serologische Techniken, wie der ELISA, sind in der Praxis gut etablierte Verfahren, mit denen ein kostengünstiger und zuverlässiger Virusnachweis ermöglicht wird.

1.3.3 Lösungsansätze zur Regulation

Kurativ kann pflanzlichen Viren nicht begegnet werden, jedoch sind präventive Maßnahmen über die Regulation der Virusvektoren möglich. Versuche zur Regulation der Vektoren mit konventionellen Insektiziden lieferten bei Stubbs (1948) und Watson et al. (1964) häufig keine befriedigende Wirkung, da die mobilen geflügelten Läuse nicht effizient durch die Insektizide erreicht werden und zudem das Virus hauptsächlich durch Zuflug der Vektoren von außerhalb in den Bestand getragen wird. Eigene Versuche zur Direktbekämpfung mit dem teilsystemischen pflanzlichen Wirkstoff NeemAzal[®], die im Rahmen eines vom Land Niedersachsen geförderten Projektes zusammen mit dem Ökoring durchgeführt wurden, erbrachten in der Saison 2002 ebenfalls keine deutliche Minderung des Anteils symptomtragender Pflanzen (Schmiegel, 2002).

1.3.3.1 Koinzidenzvermeidung (Saatzeitpunkt)

Da sich der Wirtswechsel der Gierschblattlaus in Mitteleuropa in den meisten Jahren auf wenige Tage bis Wochen im Mai konzentriert, liessen sich CMD-Befallswerte in Möhrenbeständen mit einer frühen, bzw. sehr späten Saat mit hohem Wirkungsgrad senken (Watson et al., 1994). Auch unter neuseeländischen Produktionsbedingungen wurde diese Strategie erfolgreich eingesetzt (Lowe 1971). Folglich bildete die Evaluation variiertes Saatzeitpunkte einen integralen Bestandteil für die Strategieplanung, zumal Berechnungsmöglichkeiten als Grundvoraussetzung für späte Saattermine in der norddeutschen Hauptproblemregion gegeben sind. Da die Gierschblattlaus als nicht-Kartoffelblattlaus vom routinemässigen Gelbschalen-Monitoring der Pflanzenschutzdienste (Landwirtschaftskammer Hannover) nicht ausgewertet wird, war es erforderlich eigenen Daten zum Fluggeschehen zu erheben.

1.3.3.2 Sortenwahl & Reifetyp

Die Sortenwahl ist eines der wichtigsten Instrumente, um über die Virusresistenz oder Virus-toleranz zu einer Sicherung der Erträge zu gelangen. Frischmarktmöhren, sog. 120-Tage-Sorten, zeigten in den letzten Jahren deutlich weniger Virussympptome als Verarbeitungsmöhren, sog. 180-Tage-Sorten (Rau 2002). Neben der Prüfung dieses Befundes anhand zweier gängiger Frischmarktsorten im Parzellenversuch, galt das besondere Interesse möglichen Unterschieden in der Anfälligkeit gängiger Verarbeitungssorten. Letztere sind aufgrund ihrer Verarbeitungseigenschaften für den Vertragsanbau (Babynahrung) geeignet und nicht durch Frischmarktmöhren zu ersetzen (Paffrath & Leisen 2002; Paffrath & Leisen 2002).

1.3.3.3 Infektionsquelle Nebenwirte & Samenträger

Zur Bestätigung der Arbeitshypothese auf Grundlage der beschriebenen Lebenszyklen von Virose und Vektor (vergl. Pkt. 1.3.1 S. 13) galt es Winter- und Sommerwirte im Hauptbefallsgebiet zu lokalisieren. In diesen Surveys wurde die Begleitvegetation in Stichproben auf Blattlausbesatz geprüft und Blattmaterial der Sommerwirte auf Virose getestet.

In dieser ersten Bestandsaufnahme sollten Hinweise dafür gesammelt werden, ob die Anbauintensität, relative Schlagdistanzen oder die räumliche Nähe zu besonders reservoirträchtigen Strukturen der Begleitflora wie Grünland mit Wiesenkerbel, hoher Rüben-Kälberkropf-Besatz in Strassengräben tatsächlich eine Rolle spielen. Solche Daten sollten, sofern sie eindeutig ausfallen, für präventive Empfehlung zur Vermeidung besonders befallsträchtiger Anbausituationen genutzt werden.

Für die Saatgutproduktion von Möhren sollten diese Daten der Klärung der konkreten Frage der Züchter dienen, ob eine Empfehlung zur räumlichen Separierung von Samenträgern und einjährigem Selektionsbestand wohlfundiert ist oder ob bereits einfache Massnahmen, wie rechtzeitige Netzabdeckungen, die auf das Einsetzen des Vektorfluges abgestimmt sind, eine Perspektive haben können.

2 Material und Methoden Arbeitsgruppe A: Entwicklung eines Virusnachweises

2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Für die unterschiedlichen Extraktionsmethoden wurde generell Blattmaterial verwendet. Die Proben, so sie nicht sofort verarbeitet wurden, wurden in verschlossenen Plastikbeuteln (PE-Folie) bis zu 2 Wochen im Kühlraum oder Kühlschrank bei 4°C, über längere Zeiträume bei -20°C gelagert.

2.2 Gesamtnukleinsäureextraktion mit Silica-Partikeln

Die verwendete Gesamtnukleinsäureextraktion basiert auf einer von Boom *et al.* (1990) beschriebenen Extraktion für Nukleinsäuren aus Serum und wurde nach dem von Menzel *et al.* (2002) für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzen veränderten Protokoll durchgeführt.

2.3 RNA-Extraktion mit dem Nucleo Spin RNA Plant Kit (Macherey und Nagel)

Die RNA Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers im Handbuch (Auflage 3/2002/Rev. 01) durchgeführt.

2.4 Extraktion von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Bis auf wenige Ausnahmen kommt dsRNA in virusfreien Pflanzen nicht vor. Sie konnte aber für viele (+)ssRNA-Viren, dsRNA-Viren und die ambisense RNAs bestimmter (-)ssRNA Viren erfolgreich aus infizierten Pflanzen isoliert werden. Bei den dsRNA-Viren handelt es sich hierbei um ihre genomische Nukleinsäure, bei den anderen vermutlich um Replikationszwischenstufen. Die Extraktion von dsRNA stellt somit für viele Viren eine einfache Alternative zur Virusreinigung dar, besonders wenn es darum geht, virale Nukleinsäuren zu erlangen. Von besonderem Wert ist die Methode, wenn keine Informationen über den vermeintlichen viralen Erreger vorliegen und nur wenig Pflanzenmaterial zur Verfügung steht (z.B. nur eine Möhrenpflanze), welches für eine Virusreinigung nicht ausreichend ist.

Die Extraktion von dsRNA wurde mit einer nach Valverde *et al.* (1985) modifizierten Methode durchgeführt. Die gewonnene dsRNA wird mittels Fällung durch Natriumacetat (NaAc) und EtOH konzentriert.

2.5 Natriumacetat-Ethanol Fällung

Die NaAc-EtOH-Fällung dient der Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen, wobei gegebenenfalls auch Salze und andere lösliche Bestandteile eliminiert werden. Dazu wird der Ansatz mit dem 0,1-fachen Volumen NaAc (3 M) und 2,5-fachen Volumen EtOH (bei -20°C gelagert) versetzt, kurz geschüttelt und 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgegossen und das entstandenen Nukleinsäurepellet mit 150 µl EtOH (70%, bei -20°C gelagert) gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes im Vacuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wird in 20 µl TE 10/0,1 aufgenommen.

2.6 rPCR

Zur Gewinnung von ersten Sequenzinformationen unbekannter viraler Nukleinsäuren (z.B. dsRNA) stehen verschiedenste Random-(RT)-PCR Techniken zur Verfügung. In diesem Projekt wurde die rPCR Technik in einer leicht modifizierten Form nach Froussard (1992) angewendet.

Dazu werden 8 µl dsRNA mit 2 µl UN Primer (10 µM) und 20 µl H₂O 5 min bei 99°C denaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Sofort danach wird der cDNA-Ansatz zugegeben und für 1 h bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zweitstrangsynthese. Dazu wird der Reaktionsansatz erneut 2 min bei 99°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe des dscDNA-Ansatzes 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird der Ansatz mit dem Nucleo Spin Extract Kit (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

cDNA-Ansatz

- | | |
|-------------|-------------------------------------|
| 10 µl | 5x Reverse Transcriptase Puffer |
| • 2 µl | dNTP Mix (je 25 mM) |
| • 1 µl | RNasin (20 U/µl) |
| • 1 µl | AMV Reverse Transcriptase (10 U/µl) |
| • auf 50 µl | A. bidest. |

dscDNA-Ansatz

- | | |
|--------------|----------------------------------|
| 10 µl | 10x Klenow DNA Polymerase Puffer |
| • 2 µl | dNTP Mix (je 25 mM) |
| • 2 µl | Klenow DNA Polymerase (5 U/µl) |
| • auf 100 µl | A. bidest. |

Die Amplifikation der dscDNA erfolgt mit dem Standard-Reaktionsansatz und -programm unter Verwendung des U Primers, allerdings wurde die Extensionszeit von 1:30 min auf 2:30 min heraufgesetzt und als Annealingtemperatur 55°C (statt 52°C) verwendet. Die PCR-Proben wurden im Agarosegel aufgetrennt und der amplifizierte DNA-Schmier für die Ligation und Klonierung ausgeschnitten und mit dem Nucleo Spin Extract Kit (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

Primersequenzen (N: A, G, T oder C):

UN GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN

U GCCGGAGCTCTGCAGAATTC

2.7 Bestimmung von extremen 3'-Ende viraler RNA

Um die extremen 3'-Enden viraler Nukleinsäuren zu bestimmen, kann man sich bei Viren mit polyadenylierter RNA das Poly(A)-Ende zunutze machen. indem man mit einem virusspezifischen Primer in sense Orientierung und einem Poly(T)-Primer als antisense Primer den entsprechenden Bereich amplifiziert. Ist die virale RNA am 3'-Ende nicht polyadenyliert, so muß die RNA direkt oder die entsprechende cDNA erst mit einem Poly(A)- oder Poly(G)-Schwanz (Tail) versehen werden. Mit dieser Technik können in der Regel Lücken von bis zu 800 Basen geschlossen werden. Zur Bestimmung der 3'-Enden des neuen Carla- und „Beny“-Virus wurden die spezifischen Primer in Kombination mit dem Poly(T)-Primer eingesetzt. Dabei wurde dsRNA unter Standardbedingungen für die cDNA-Synthese und PCR eingesetzt. Zur Bestimmung des 3'-Endes des CYLV wurde der indirekte Weg über geteilte cDNA gewählt. Dazu wurden 4,5 µl dsRNA-Extrakt des CYLV mit 1 µl CYLV-3' Primer und 19,5 µl H₂O 5 min bei 99°C denaturiert und anschließend auf Eis 5 min abgekühlt. Anschließend wurde der cDNA-Syntheseansatz zugegeben und 60 min bei 42°C inkubiert, die Reverse Tanskriptase 10 min bei 70°C inaktiviert und anschließend der Ansatz auf Eis abgekühlt, mit 2 µl RNaseH (Promega, 1,5 U/µl) versetzt und 30 min bei 37°C zum Abbau der RNA des entstandenen RNA/cDNA-Hybrids inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird der Ansatz mit dem Nucleo Spin Extract Kit (Macherey und Nagel) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und in 35 µl eluiert. Zur Synthese des Tails wurde dann der Tailing-Ansatz 3 min bei 94°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1,5 µl Terminaler Transferase (MBI, 25U/µl) 10 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte für 10 min bei 65°C. Zur Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids wurden 2 unterschiedliche Tails verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit dem Standard-PCR-Ansatz und je nach Tail unter Verwendung des Poly(C)- bzw. Poly(G)-Primers.

cDNA-Synthese-Ansatz:

10 µl	5x Reverse Transcriptase Puffer
0,5 µl	MMuLV Reverse Transcriptase
0,5 µl	dNTP Mix (je 25 mM)
14 µl	A. bidest.

Tailing-Ansatz:

5 µl	5x Terminale Transferase Puffer
2,5 µl	dCTP/dGTP (2 mM)
16 µl	cDNA

Primersequenzen:

CYLV-3'	AGCGTTGAACCCTACGTTCCGAA
Beny-3'	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
Carla-3'	GGGTTGATTGGTACTCTTAGGCTTAGGA
Poly(T)	TTTTTTTTTTTTTTTTTT(A/G/C)
Poly(C)	GCTCTAGACGCCCCCCCCCC

Poly(G) AACTGCAGAAGGGGGGGGGG

2.8 Virusspezifische Primer

Die Alignments der relevanten Bereiche der zur Primerauswahl verwendeten Virussequenzen, wurden mit dem Programm ClustalX (Higgins und Sharp, 1.64b/1988) durchgeführt. Für das Primerdesign wurde das Programm Oligo (Rychlik, 4.0/1991) verwendet. An einzelnen Positionen enthalten die Primer verschiedene Nukleotide oder als universelle Base Inosin (I). Die Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) oder Biomers (Ulm) synthetisiert. Die Sequenzen der virusspezifischen Primer, die für den Nachweis der einzelnen Viren eingesetzt wurden, sind unten angegeben.

Virusspezifische Primer (erwartete Fragmentgröße in Klammern):

CtRLV	s	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
(381 bp)	as	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
CMoMV	s	GAGACAAAGGGCTAGGTATGAGCAA
(625 bp)	as	GCAATCGTCACCCTTGTCATCAA
CYLV	s	ATACCATGGCAGAAAACGACTCTAATGA
(671 bp)	as	GTGCTCGAGATGTTTCCCGATTTCGTA
CTLV	s	CACCAGGAAGACAAGGATGCTGACAA
(959 bp)	as	GAAGTCAGGCACTGACACGTTTGAA
PYFV	s	TACTATGAGCCGTTGAACATGTCCAC
(368 bp)	as	CCCACCATAATACCGTGCTTATGTC
Carlavirus	s	TACCAGTGGGAGTAGTGCAGA
(607 bp)	as	TATAATTCCACATGATGGGAG
Benyvirus	s	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
(430 bp)	as	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

2.9 cDNA-Synthese

Für die RT-PCR wurde ein 2-Schritt-Verfahren gewählt, so dass zuerst die cDNA-Synthese durchgeführt werden musste. Bei dsRNA als Template wurde vorab die dsRNA alleine mit den Primern für 5 min bei 99°C zur Denaturierung inkubiert und vor Zugabe der restlichen Bestandteile des cDNA-Reaktionsansatzes auf Eis abgekühlt.

cDNA-Reaktionsansatz:

- 5 µl 5x RT Puffer
- 0,5 µl dNTP Mix (je 25 mM)
- 0,5 µl RNasin (20 U/µl)

- 0,25 µl MMuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)
- 0,2 µl Random Hexamere (500 µg/ml)
- 3 µl RNA
- auf 25 µl A. bidest.

cDNA-Programm:

45 min 42°C

10 min 72°C

2.10 Standard-PCR

Im Folgenden sind der verwendete Standard-PCR-Ansatz und das zugehörige Standard-PCR-Programm aufgeführt, welches für alle spezifischen Amplifikationen verwendet wurde.

PCR Reaktionsansatz:

- 2,5 µl 10x *Taq* PCR Puffer
- 2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,25 µl dNTP Mix (je 25 mM)
- 0,05 µl *Taq* Polymerase (5 U/µl)
- je 0,75 µl je sense und antisense Primer (10 µM)
- 2 µl cDNA
- auf 25 µl A. bidest.

Standard-PCR-Programm:

Denaturierung 2 min 95°C

34 Zyklen (20 sec 94°C, 30 sec 52°C, 1:30 min 72°C)

Abschlußsynthese 10 min 72°C

2.11 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Nukleinsäureextrakten, PCR-Produkten und Plasmidaufreinigungen wurden Agarosegele verwendet. Als Standardkonzentration werden 1%-ige Gele, für hochmolekulare dsRNA 0,8%-ige Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde in mit 1x TAE-Puffer gefüllten Standard-Horizontalkammern verschiedener Hersteller mit variierendem Elektrodenabstand nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Nukleinsäurefarbstoff wurde Ethidiumbromid verwendet. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf einem Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde mit *Pst*I gespaltene DNA des λ-Phagen oder verschiedene kommerziell erworbene DNA-Standards verwendet. Die Dokumentation erfolgte photographisch auf Photopapier oder in digitaler Form.

2.12 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen

Wenn mittels Elektrophorese aufgetrennte Nukleinsäuren (u.a. PCR-Produkte, Vektoren) z.B. in der Ligation mit anschließender Klonierung eingesetzt werden sollen, müssen sie vorab aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt werden. Dafür wurde das Nucleo Spin Extract Kit (Macherey und Nagel) verwendet. Dazu wird die auf dem Transilluminator sichtbare Bande mit einem sterilen Skalpell möglichst exakt aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers im Handbuch (Auflage 3/2002/Rev. 01) durchgeführt.

2.13 Vektor-Herstellung und -Ligation

Für eine erfolgreiche Ligation müssen Fragment und Vektor passende Enden besitzen, die von der DNA-Ligase zusammengefügt werden können. Dazu werden der Vektor und das entsprechende Fragment jeweils in einem Spaltungsansatz 2 h bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert, über ein Agarose-Gel aufgetrennt und aufgereinigt. Auf diese Weise vorbereitete Vektoren und Fragmente werden in der Ligation eingesetzt. Desweiteren besteht auch die Möglichkeit, PCR-Produkte unter Verwendung von T-Vektoren direkt zu klonieren, da die *Taq*-DNA-Polymerase die Eigenschaft besitzt, den PCR-Produkten am 3'-Ende in der Regel ein Adenosin-Nucleotid anzufügen (Clark, 1988). Dadurch können die Fragmente für das sogenannte T/A-Klonieren eingesetzt werden, auf den Einsatz von Restriktionsenzymen zur Vorbereitung kann somit verzichtet werden (Holton und Graham, 1991). Für die T/A-Klonierung wurde der T-Vektor pGEM-T (Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet, für die Expression viraler Proteine der Expressionsvektor pET-28a (Novagene).

Spaltungsansatz für Vektoren/Fragmente:

- 6 - 14 µl Vektor/PCR Fragment
- 20 U Restriktionsenzym (bei zwei verschiedenen Enzymen je 10 U)
- 2 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer
- auf 20 µl A. bidest.

Um den Vektor mit dem gewünschten Fragment kovalent zu verbinden, wird der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wird anschließend in der Transformation eingesetzt.

Ligationsansatz:

- 1 µl Vektor
- 1-3 µl DNA-Fragment
- 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)
- 5 µl 2x Ligationspuffer
- auf 10 µl A. bidest.

2.14 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Die Transformation wird nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983) durchgeführt. Für die Expression wurde der Bakterienstamm BL21 (Amersham-Pharmacia), für alle anderen Transformationen der Stamm DH5 α (Invitrogen) verwendet.

2.15 Selektion transformierter Zellen

Um den Erfolg der Transformation gleichzeitig mit der Kultur der Bakterien kontrollieren zu können, werden Aliquote der Ansätze auf Selektivmedien ausplattiert. Aliquote von 100 μ l jeder Flüssigkultur werden auf Platten mit AX-Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht angezogen. Bei Verwendung des Expressionsvektors wurde generell Kanamycin als Antibiotikum zur Selektion transformierter Zellen eingesetzt.

LB-AX-Medium:

- 150 mg Ampicillin/ml
- 40 mg X-Gal/ml Dimethylformamid (DMF)

Zu 1000 ml ca. 50°C warmem LB-Medium geben.

Da die Bakterien der einzelnen Kolonien nicht immer das gewünschte Insert enthalten, ist es notwendig, die Insertgröße zu überprüfen. Hierbei kann auf eine Aufreinigung der Plasmide aus den Bakterien verzichtet werden. Die einzelnen Bakterienkolonien werden mit einem Zahnstocher in 80 μ l LB-Flüssigmedium überführt und nach kurzem Schütteln bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Amplifikation erfolgt mit untenstehendem PCR-Reaktionsansatz und PCR-Programm. Die verwendeten Primer flankieren den Insertionsort in der Weise, daß an beiden Seiten des Inserts kurze Abschnitte des Plasmids mit amplifiziert werden.

PCR-Reaktionsansatz:

2 μ l	Bakteriensuspension
2,5 μ l	10x PCR Puffer
2,5 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,25 μ l	dNTP Mix (25 μ M je dNTP)
je 0,75 μ l	je Primer (10 μ M)
0,1 μ l	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)
auf 25 μ l	A. bidest.

PCR-Programm:

32 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 49°C, 1,30 min 72°C)

Abschlußsynthese 10 min 72°C

Primersequenzen (für pGEM-T wurden die Primer T7/SP6, für pet28a T7/T7term verwendet):

SP6 CGATTTAGGTGACACTATAG

T7 TAATACGACTCACTATAGGG
T7term CTAGTTATTGCTCAGCGGT

2.16 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA für die Auftragssequenzierung

Da die Qualität (Reinheit) der Plasmide für den Sequenziererfolg von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Plasmide für die Auftragssequenzierung mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey und Nagel) aufgearbeitet. Dazu werden jeweils 3 ml LB-AP-Flüssigmedium mit 20 µl Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Danach werden 2 ml abgenommen und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Isolierung der Plasmid-DNA entsprechend den Angaben des Herstellers im Handbuch (Auflage 3/2002/Rev. 01) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte durch MWG-Biotech (Ebersberg) oder SequiServe (Vaterstetten).

LB-AP-Flüssigmedium:

- 150 mg Ampicillin/ml Wasser

Zu 1000 ml ca. 50°C warmem LB-Medium (ohne Agar) geben.

2.17 Sequenzauswertung

Um die Identität der amplifizierten Fragmente zu überprüfen, wurden die erhaltenen Sequenzen mit dem Programm ClustalX (Higgins und Sharp, 1.64b/1988), DNA-Man (Lynnon Bio-Soft, 4.02/1998) ausgewertet und/oder mit den in der Genbank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) vorhandenen Sequenzen verglichen.

2.18 Erstellung von Dauerkulturen

Um eine dauerhafte Verfügbarkeit von Bakterienkulturen zu ermöglichen, können sogenannte „Dauerkulturen“ erstellt werden. Dabei nutzt man die Möglichkeit, dass Bakterienkulturen durch Zugabe von Glycerin bei -20°C nahezu unbegrenzt lagerbar sind. Dazu werden 250 µl der Bakterienlösung mit 335 µl 87%-igem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. Die Bakterien können nach dem Auftauen sofort in den entsprechenden Medien weiterkultiviert werden.

2.19 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. D.-E. Lesemann am BBA-Institut PS durchgeführt. Es kamen einfache Tropfpräparate und ISEM (immunosorbent electron microscopy) mit Dekoration unter Verwendung entsprechender Antiseren zur Anwendung. Zur Extrakterstellung wird mit der Rückseite einer Pasteurpipette ein kreisrundes Gewebestück ausgestanzt und in einem Tropfen Phosphatpuffer homogenisiert. Anschließend wird für ein Tropfpräparat ein mit Pioloform beschichtetes und mit Kohle bedampftes Kupfernetz auf einem Tropfen des Homogenats 5 min inkubiert, mit 30 Tropfen A. bidest. gespült, mit einem Stück Filterpapier vom Rand aus getrocknet und mit 5 Tropfen Uranylacetat (1% in A. bidest.) kontrastiert. Das überschüssige Uranylacetat wird ebenfalls mit einem Stück Filterpapier seitlich abgezogen. Die Netze wurden bei verschiedenen Vergrößerungen (ca. 30.000x bis 400.000x) mikroskopiert.

Bei ISEM mit anschließender Dekoration wurden die Netze zuerst 15 min mit den entsprechenden Antiserum (1:1000 verdünnt) beschichtet und anschließend über Nacht auf dem Blattextrakt inkubiert. Die Dekoration erfolgte für 15 min mit dem 1:50 verdünnten Antiserum. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit A. bidest. gespült.

Phosphatpuffer (pH 7):

38,8 ml	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 0,5 M)
61,2 ml	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , 0,5 M)
auf 500 ml	A. bidest.

2.20 Kultur von Pflanzen im Gewächshaus

Die verwendeten Pflanzen wurden in Klasmann Tonsubstrat kultiviert. Die Kultur erfolgte bei 20°C/18°C Tag-/Nachttemperatur und mindestens 10 klx (Assimilationszusatzbelichtung) für 14 h. Pflanzenschutz und Flüssigdüngung erfolgten nach Bedarf.

2.21 Übertragungsversuche

Zur Isolierung, möglichen Identifizierung, Bestimmung des Wirtskreises und/oder Erhaltung wurde versucht, die (vermeintlichen) viralen Erreger zu übertragen. Die Pflanzen wurden aus Samen angezogen und in insektensicheren Gewächshäusern kultiviert, um eine unbeabsichtigte Infektion mit Viren zu verhindern.

Mechanische Übertragung

Dabei wird Pflanzengewebe im Gewicht/Volumen Verhältnis von 1:4 in Inokulationspuffer gemörsert und mit einem Glasfuß mit leichtem Druck auf mit Karborund bestäubte, nicht vollständig entwickelte Blätter gestrichen, um über die so erzeugten Verletzungen der Zellwände eine Virusinfektion zu ermöglichen. Anschließend werden die inokulierten Blätter mit Wasser abgespült.

Inokulationspuffer (pH 7):

0,06 g	Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
0,82 g	Na_2HPO_4
0,45 g	NaDIECA
0,057 g	Natrium-Thioglycolat
0,037 g	EDTA
auf 100 ml	A. bidest.

Kurz vor Gebrauch Aktivkohle (5 mg/ml) zugeben.

Blattlausübertragung

Die für die meisten bekannten Möhreviren als Vektor beschriebene/in Frage kommende Gierschblattlaus (*Cavariella aegopodii*) wurde im Käfig auf Selleriepflanzen für Übertragungsversuche vermehrt und vorgehalten. Für die Übertragung wurden jeweils ca. 10 Läuse

für 3-4 Tage auf die infizierten Pflanzen aufgesetzt und nach Umsetzen auf die zu infizierenden Pflanzen dort ebenfalls mindestens 3 Tage belassen.

Die in den verschiedenen Übertragungsversuchen verwendeten Pflanzenarten sind in im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt.

2.22 Expression viraler Proteine

Für nicht als Reinigung vorliegende Viren können, falls die Nukleinsäuresequenzen der entsprechenden Gene bekannt sind, auch die einzelnen Strukturproteine in Expressionssystemen (z.B. Bakterien, Hefen, zellfreie Systeme) synthetisiert werden, um als Ausgangsmaterial für eine Immunisierung zur Antiserumgewinnung eingesetzt werden zu können. In diesem Projekt wurde für die Expression der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21 (Amersham-Pharmacia) verwendet. Die für die Amplifikation der zu exprimierenden Gene verwendeten Primer wurden an ihrem 5'-Ende mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen, so dass eine Ligation in den Expressionsvektor pET-28a (Novagen) über die Schnittstellen *NcoI/XhoI* für das CYLV und neue „Beny“-Virus und *HindIII/XhoI* für die 3 verschiedenen CtRLV-Hüllproteine erreicht wurde. Somit ergeben sich für das CYLV und „Beny“-Virus am N-terminalen Bereich des Proteins eine Fremdaminosäure, am C-terminalen Bereich 5 Fremdaminosäuren und der vom Vektor kodierte Histidin-Tag, der für die Aufreinigung der exprimierten Proteine notwendig ist. Für die CtRLV-Hüllproteine ergeben sich am N-terminalen Bereich 43 Fremdaminosäuren, der C-terminale Bereich entspricht dem oben genannten. Eine *NcoI/XhoI* Strategie war bei den CtRLV-Hüllproteinen nicht möglich, da die Hüllproteingene eine *NcoI*-Schnittstelle enthalten. Für das CtRLV-Isolate aus Kalifornien wurde der Primer CtRLV-CPEs1, für die aus Hassel und Aschersleben der Primer CtRLV-CPEs2 eingesetzt.

Die Hüllprotein/Vektor-Konstrukte wurden nach Bestätigung der Sequenz durch Auftragssequenzierung in den Expressionsstamm transformiert und auf Kanamycin enthaltenden LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Einzelkolonie wurde in 50 ml Kanamycin enthaltenden LB-Flüssigmedium angeimpft und für ca. 4:30 h bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 bei 37°C auf dem Schüttler angezogen. Anschließend wurde die Expression mit 0,5 ml IPTG (0,1 M) induziert und für weitere 3 h inkubiert. Die Bakterienzellen wurden bei 4000 g pelletiert (GSA Rotor in Sorvall RC5B) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde danach in 5 ml Lysis-Puffer aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und 6-mal für 10 sec mit Ultraschall (bei 250 W) behandelt. Anschließend wurden für 30 min bei 4°C und 10.000 g die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Abschließend wurden die rekombinanten Proteine über Ni-NTA-Säulen (Qiagen) nach Protokoll 14 für Histidin-Tag Proteine entsprechend den Herstellerangaben im Qiagen QIAexpressions Handbuches (03/1997) aufgereinigt.

Primersequenzen:

CtRLV	CPEs1	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
	CPEs2	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
	CPEas	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
CYLV	CPEs	ATACCATGGCAGAAAACGACTCTAATGA
	CPEas	GTGCTCGAGATGTTTCCCGATTTCGTA

„Beny“-Virus CPEs	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)
CPEas	Sequenz auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

2.23 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größentrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (4%iges Sammelgel, 12%iges Trenngel) in vertikalen Elektrophoresekammern eingesetzt (nach Sambrook *et al.*, 1989). Die Gele wurden zum Färben über Nacht in Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung mit Entfärbelösung erfolgte 3-mal für 1 h. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden verschiedene kommerziell erhältliche Größenstandards verwendet. Die gewünschten Proteinbanden wurden mit einem sterilen Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten.

2.24 Reinigung des CtRLV

Die Reinigung des zuvor mit Blattläusen auf Möhren vermehrten Isolates CtRLV-Hassel wurde im Dezember durchgeführt, um auf konventionellem Weg ein Antiserum zu erzeugen. Dazu wurden 260 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit dem doppelten Volumen 0,1 M Na-Citrat (pH 6), 0,5% Onozuka R-10 Cellulase, 0,5% Macerozym R-10, 0,1% Thioglycol und 0,5% Ethanol versetzt und 4 h bei 25°C gerührt. Nach kurzem Mischen (5 min) mit dem 0,5-fachen Volumen Chloroform:Butanol (1:1) wird zur Phasentrennung bei 10.000 rpm (Sorvall GSA) für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen, mit 1% Triton X-100 für 30 min gerührt und nach Zugabe von 8% Polyethylenglycol 6000 und 0,4 M NaCl für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird der Ansatz für 1 h stehen gelassen, bevor er für 20 min bei 12000 rpm (Sorvall GSA) und 15°C zentrifugiert wird. Das entstandene Pellet wird in 80 ml 0,1 M Na-Citrat + 5% Ethanol aufgenommen und über Nacht bei 4°C gerührt, anschließend für 15 min bei 9000 rpm (Sorvall GSA) und 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde geteilt, jeweils mit 15 ml einer 30%igen Zuckerlösung in Na-Citrat unterschichtet und für 4 h bei 30.000 rpm ultrazentrifugiert (Beckmann 45Ti). Die resultierenden Pellets wurden in 4 ml Na-Citratpuffer aufgenommen, mit 0,92 g Cäsiumsulfat (Cs₂SO₄) versetzt und mit 0,9 ml Cs₂SO₄-Puffer (Ansatz: 1,59 g Cs₂SO₄ auf 3 g Gesamtgewicht aufgefüllt mit 0,1 M Na-Citrat) unterschichtet. Anschließend wurde für 17 h bei 10°C ultrazentrifugiert (Beckmann 45 TI). Die an der Grenzschicht entstandene Virusbande wurde abgesaugt, elektronenmikroskopisch untersucht und zur Immunisierung verwendet.

2.25 Gewinnung von Antiseren

Zur Immunisierung wurden die Gelstücke in 1 ml H₂O oder ein Aliquot der Virusreinigung und 1 ml Freund's Adjuvans-complete im Mörser homogenisiert und in den Hinterschinkel eines mindestens 6 Monate alten Kaninchens gespritzt. Darauf folgend wurden im mindestens wöchentlichen Abstand 2-3 weitere Injektionen vorgenommen, diesmal wurde Freund's Adjuvans-incomplete verwendet. Die Blutabnahmen von bis zu 10 ml wurden ca. 10 Tage nach der 2. Immunisierung begonnen. Das Blut wurde mehrere Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C stehen gelassen, damit sich der Blutkuchen absetzen konnte. Das antikörperhaltige Serum wurde danach mit kleinen Glaskugeln von weiteren festen Blutbestandteilen gereinigt, mit Natriumazid konserviert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3 Ergebnisse der Arbeitsgruppe A: Entwicklung eines Virusnachweises

3.1 Carrot red leaf virus

Das *Carrot red leaf virus* (CtRLV) gehört zur Familie *Luteoviridae*, besitzt ein monopartites Genom, isometrische Partikel und wird durch die Blattlausart *Cavariella aegopodii* persistent übertragen (D'Arcy et al, 2001). Das Virus kann an Möhren starke Blattrötungen, Chlorosen und einen gestauchten Wuchs verursachen und gilt als weltweit verbreitet (Waterhouse und Murant, 1982). Nach van Dijk und Bos (1989) ist das CtRLV neben dem *Anthriscus*-Stamm des *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) das wirtschaftlich bedeutendste Virus im niederländischen Möhrenanbau.

In den Genbanken sind Sequenzinformationen von kurzen Abschnitten im Bereich der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) verfügbar. Zu Beginn der Untersuchungen lagen zwei CtRLV-Isolate, aus Möhre (Kalifornien) und Dill (Aschersleben), sowie die zugehörigen konventionell (über Virusreinigung) erzeugten Antiseren vor. Obendrein standen CtRLV-verdächtige Pflanzen aus Hassel zur Verfügung. Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen (ISEM und Dekoration) haben gezeigt, dass sich das jeweilige Isolat nur mit dem homologen Antiserum nachweisen ließ und beide verfügbaren Antiseren unter anderem keine CtRLV-Infektion in den verdächtigen Proben Möhre-Hassel und Möhre-Kiel nachweisen konnten. Mit dem konventionell erzeugten Antiserum gegen das Isolat Dill-Aschersleben konnte das CtRLV in vielen Umbelliferen (*Trachymene pilosa*, *Conium maculatum*, *Endresia pyrenaica*, *Pimpinella tragium*, *Bupleurum tenuissimum* und Petersilie [*Petroselinum crispum*]) nachgewiesen werden, nicht aber in Möhre (*Daucus carota*) (Rabenstein, persönliche Mitteilung). Auch van Dijk und Bos (1989) beschreiben aufgrund Ihrer Untersuchungsergebnisse das mögliche Vorkommen von Wirtskreis-Varianten des CtRLV oder nah verwandter Viren, ohne sie jedoch näher serologisch oder molekular zu charakterisieren.

Zur Aufklärung der CtRLV-Variabilität wurden von Sequenzalignments verschiedener Poleroviren degenerierte Primer abgeleitet, die unter anderem den Hüllprotein(CP)-Bereich der CtRLV-Isolate amplifizieren sollten. Die entwickelten Primer wurden an verschiedenen CtRLV-Herkünften bzw. verdächtigen Proben eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert und miteinander verglichen. Die erhaltenen Hüllprotein-Sequenzen (vollständig für Dill-Aschersleben, Möhre-Hassel und Möhre-Californien; Rest Teilsequenzen) zeigen eine unerwartet hohe Variabilität der verschiedenen Isolate.

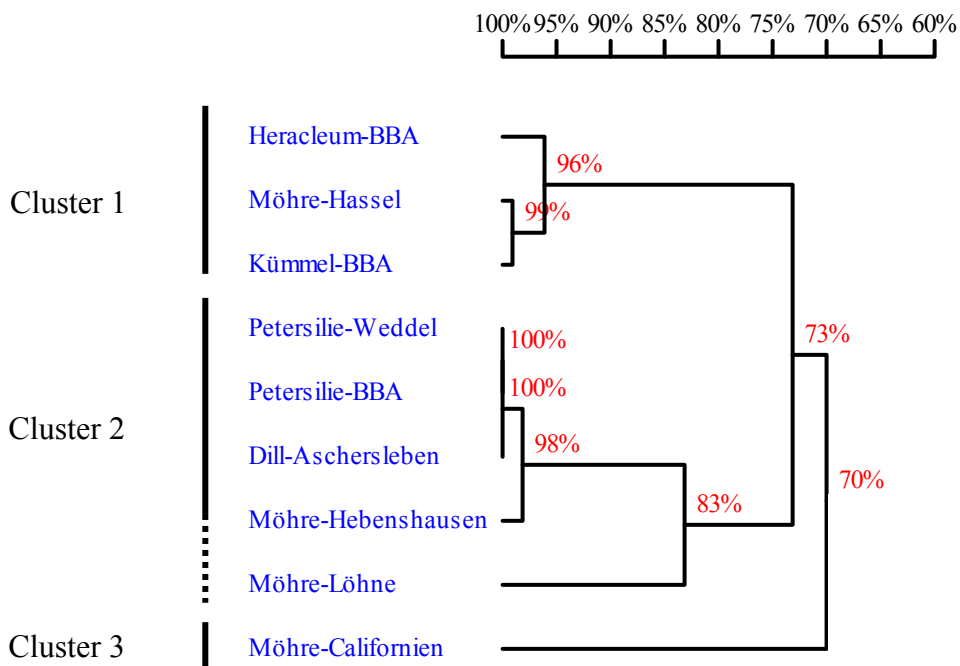


Abb. 2: Ähnlichkeit der Hüllproteinsequenzen verschiedener Isolate des CtRLV.

Es bilden sich 3 deutlich unterscheidbare Cluster, die untereinander weniger als 75% Sequenzähnlichkeit aufweisen, wobei die Sequenzen innerhalb eines Clusters jedoch mit über 90% hohe Ähnlichkeiten zeigen. Einzige Ausnahme ist das Isolat Möhre-Löhne, welches mit 83% am nächsten am Cluster um Dill-Aschersleben und Möhre Hebenschhausen liegt. Ein mit dem kalifornischen CtRLV-Isolat nah verwandtes deutsches Isolat wurde nicht gefunden. Die Ähnlichkeiten der Isolate innerhalb eines Clusters entsprechen der üblichen Sequenzvariabilität vieler Viren, die Unterschiede zwischen den Clustern sind jedoch ungewöhnlich groß für eine Virusspezies, so dass es sehr fraglich erscheint, ob sie wirklich einer Spezies zugeordnet werden können. Unter Berücksichtigung der Demarkationskriterien für Spezies der Familie *Luteoviridae* (D'Arcy et al., 2001) sind die vorliegenden Sequenzinformationen (d.h. Aminosäuresequenzunterschiede von über 10%) und serologische Unterscheidbarkeit ausreichend erfüllte Kriterien für die Trennung in unterschiedliche Spezies. Danach wäre auch das Isolat Möhre-Löhne als separate Pterovirus-Art zu betrachten. Von mehreren Isolaten wurden auch Abschnitte im Bereich der RdRp sequenziert und mit den in der Genbank verfügbaren Sequenzen von zwei Isolaten aus Großbritannien verglichen. Insgesamt zeigen sich im Vergleich zu den Hüllproteinsequenzen höhere Sequenzähnlichkeiten. Auch hier sind die Isolate Dill-Aschersleben und Petersilie-BBA vergleichbar den Ergebnissen der Hüllproteine mit 98% sehr ähnlich. Die Isolate Möhre-Hassel und Möhre-Kiel bilden zwei weitere getrennte Äste, wobei die beiden Isolate aus Großbritannien mit dem Isolat Möhre-Kiel die höchsten Ähnlichkeiten zeigen. Vergleichsmaterial aus Großbritannien zur Sequenzierung der Hüllproteingene konnte leider nicht beschafft werden.

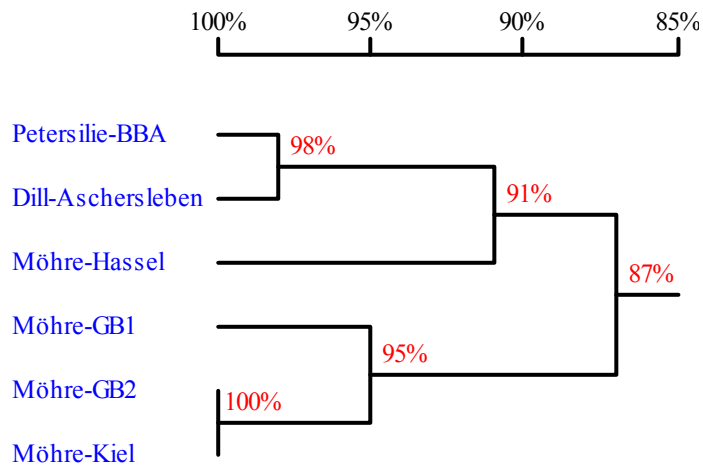


Abb. 3: Aminosäuresequenzähnlichkeit der RdRps verschiedener Isolate des CtRLV.

(Möhre-GB1: AX404765; Möhre-GB2: AAQ00930)

Vergleiche der Hüllproteinsequenzen jeweils eines Vertreters der 3 Cluster mit anderen Viren der Gattung *Polerovirus* zeigen, dass die CtRLV-Isolate einen eigenen Zweig bilden. Betrachtet man die Sequenzähnlichkeiten der anderen Poleroviren untereinander im Vergleich zu den CtRLV-Isolaten untereinander (Abb. 4), so ist aufgrund der Hüllproteinsequenzen eine Trennung der 3 Cluster in 3 Virusspezies durchaus gerechtfertigt. Die unter Verwendung der 2 verfügbaren Antiseren festgestellten serologischen Unterschiede der 3 Cluster und die hohe Sequenzvariabilität im Hüllprotein machen deutlich, dass es äußerst unwahrscheinlich erscheint, mit einem einzigen Antiserum alle schon jetzt bekannten CtRLV-Varianten zuverlässig nachweisen zu können. Die vollständigen Hüllproteingene der Isolate Dill-Aschersleben (translatiert 23 kDa), Möhre-Hassel (23,5 kDa) und Möhre-Kalifornien (22,5 kDa) wurden in einen Expressionsvektor kloniert und exprimiert. Anschließend wurden die aufgereinigten exprimierten Proteine zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die so erhaltenen 3 Antiseren zeigten aus nicht bekannter Ursache leider keine Eignung zum serologischen Nachweis der CtRLV-Isolate.

30 Ergebnisse der Arbeitsgruppe A:

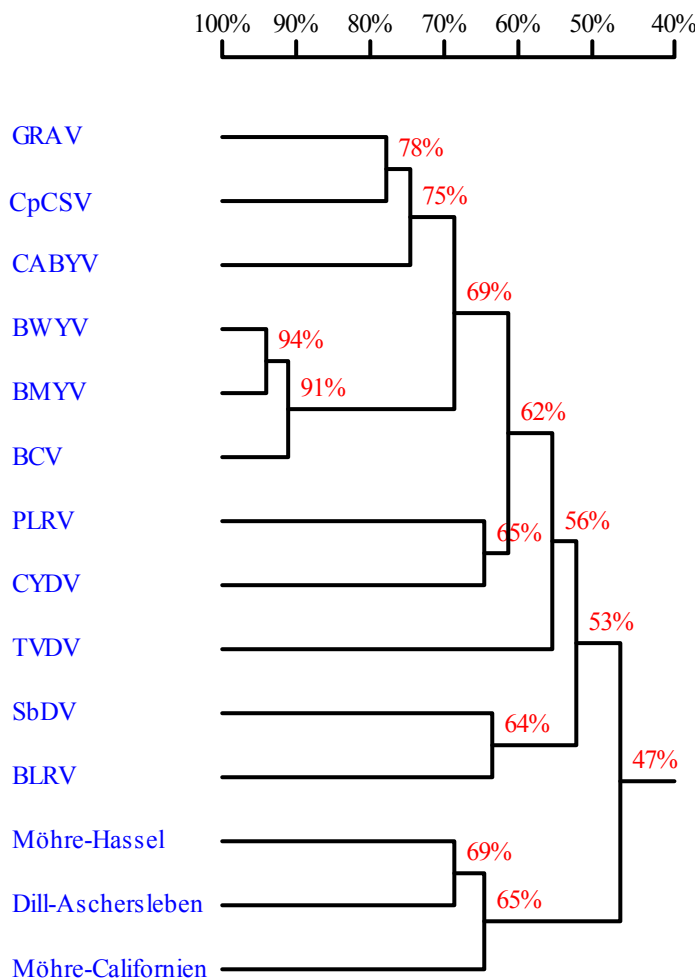


Abb. 4: Ähnlichkeit der Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren der Familie *Luteoviridae* im Vergleich mit den neu ermittelten CtRLV-Sequenzen.

(GRAV: *Groundnut rosette assistor virus*, CpCSV: *Chickpea chlorotic stunt virus*, CABYV: *Curcubit aphid-borne yellows virus*, BMJV: *Beet mild yellowing virus*, BWYV: *Beet western yellows virus*, BCV: *Beet chlorosis virus*, CYDV: *Cereal yellow dwarf virus*, PLRV: *Potato leafroll virus*, TVDV: *Tobacco vein distortion virus*, BLRV: *Bean leafroll virus*, SbdV: *Soybean dwarf virus*)

Zwar erlauben die entwickelten RT-PCR-Primer den Nachweis der hier beschriebenen CtRLV-Varianten, da so die Sequenzinformationen gewonnen wurden, offen bleibt jedoch, ob nicht noch weitere CtRLV-Varianten vorkommen, die auch mit den entwickelten Primern nicht nachgewiesen werden. Zur weiteren Entwicklung eines sicheren Nachweisverfahrens und zur Klärung des Status der Cluster (Isolate/Stämme eines Virus oder verschiedene Spezies) sind umfangreiche weitergehende Untersuchungen zum CtRLV unabdingbar.

Die Reinigung des zuvor mit Blattläusen auf Möhren vermehrten Isolates CtRLV-Hassel wurde Ende Dezember 2003 durchgeführt, um auf konventionellem Weg ein Antiserum zu erzeugen. In der Reinigung ließen sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen isometrische Viruspartikel nachweisen. Dieses Viruspräparat, das im Hinblick auf Partikelkonzentration und Reinheit nicht optimal zu sein schien, wurde zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Weil für die Reinigung des CtRLV-Isolates Hassel nur eine beschränkte Menge an infiziertem Blattmaterial zur Verfügung stand, konnte das Kaninchen

nur einmal immunisiert werden. Trotzdem wurden die erhaltenen Blutabnahmen im ELISA auf nachweisbare Antikörperkonzentrationen und -reaktivitäten getestet. Hierbei ließ sich eine sehr schwache Reaktion mit dem homologen Virusisolat Hassel, nicht jedoch mit anderen CtRLV-Isolaten und mit gesunden Möhren nachweisen. Da sich diese Befunde auch immunelektronenmikroskopisch nicht bestätigen ließen, erscheint die Brauchbarkeit des konventionell hergestellten Antiserums gegen das Isolat Hassel zweifelhaft.

Eine Übertragung und Vermehrung des Isolates Möhre-Kiel wurden ebenfalls zur Antiserumgewinnung begonnen, um zumindest für jedes Cluster einzeln eine serologische Nachweismöglichkeit in naher Zukunft zu erlangen. Das CtRLV konnte in vielen Proben unterschiedlicher Herkünfte in Deutschland und verschiedenen wilden und kultivierten Umbelliferen mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Das Gelphoto zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung repräsentativer PCR-Produkte für das CtRLV und alle anderen Viren, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

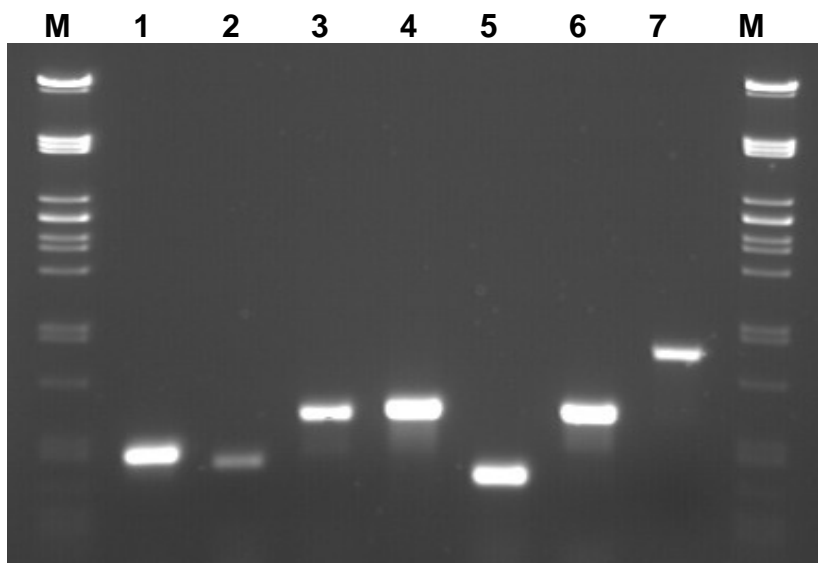


Abb. 5: Gelelektrophoretische Auftrennung repräsentativer PCR-Produkte positiver Proben (M: Größenstandard, 1-7: CtRLV, „Beny“-Virus, CMoMV, CYLV, PYFV, Carlavirus, CTLV).

3.2 Carrot mottle mimic virus / Carrot mottle virus

Das *Carrot mottle mimic virus* (CMoMV) und *Carrot mottle virus* (CMoV) sind zwei nah verwandte Virusarten der Gattung *Umbravirus*. Da Viren dieser Gattung ein Hüllprotein fehlen, können sie keine konventionellen Viruspartikel bilden. Deswegen sind sie für die Übertragung von Pflanze zu Pflanze (durch einen Vektor) auf das Hüllprotein eines Helfervirus angewiesen. Das CMoMV-Genom besitzt 4 ORFs, die Funktion des Genprodukts von ORF 1 ist nicht bekannt, das ORF 2 kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ORF 3 und ORF 4 für Transportproteine (MP) (Abb. 6).

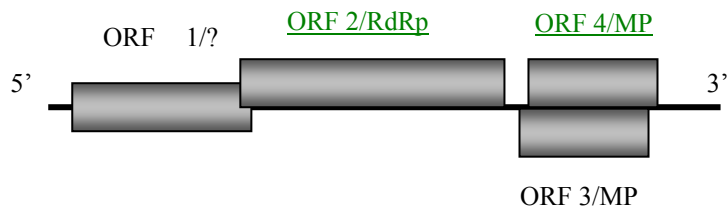


Abb. 6: Genkarte des CMoMV

Für diese beiden Viren wurde das CtRLV als Helfer identifiziert. Darüber hinaus sind beide Viren im Gegensatz zum CtRLV auch mechanisch übertragbar. Als Symptome an Möhren sind neben Chlorosen, Rötungen und Scheckungen der Blätter auch starke Stauchungen der Pflanzen in Mischinfektion mit dem CtRLV beschrieben, Pflanzen ohne CtRLV sollen dagegen symptomlos bleiben (Murant, 1974). Das CMoMV wurde in Australien entdeckt sowie vollständig sequenziert und unterscheidet sich vom CMoV, in Schottland beschrieben und bisher nicht sequenziert, deutlich bei der Hybridisierung mit cDNA-Sonden des jeweiligen anderen Virus. So konnten für das RdRp-Gen schwache Hybridisierungssignale beobachtet werden, nicht aber für die anderen ORFs (Gibbs et al., 1996a und 1996b). Erst in diesem Jahr wurden kurze Sequenzabschnitte (311 nt) des RdRp-Gens verschiedener Isolate des CMoV aus Großbritannien veröffentlicht (für die Sequenzvergleiche wurde das Isolat mit der Accession-Nr. AY325509 verwendet), die sehr hohe Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Weitere unveröffentlichte Sequenzabschnitte des RdRp-Gens eines schottischen und belgischen Isolates wurden von Frau Prof. Dr. Höfte (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden aus der dsRNA einer Möhre (Möhre 11/2001, Feld Bingenheim, stark gestauchter Wuchs mit chlorotischen Blättern und verkümmertem Rübenkörper), in der auch das CYLV, CtRLV, „Beny“-Virus und Carlavirus nachgewiesen konnten, mittels rPCR mehrere Klone mit hohen Sequenzähnlichkeiten zu der in der Genbank verfügbaren vollständigen Sequenz des CMoMV (Accession Nr. U57305) erhalten.

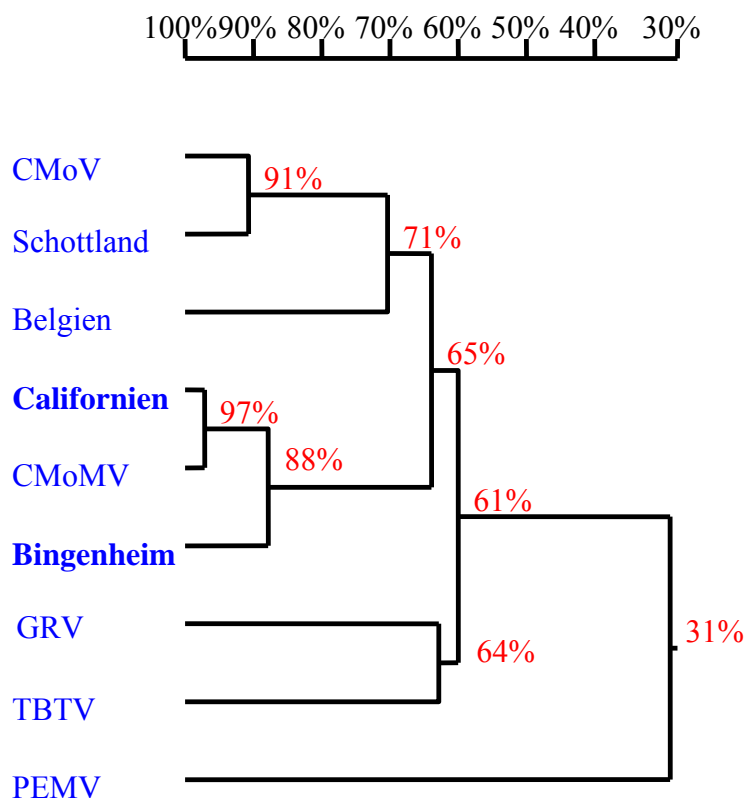


Abb. 7: Aminosäuresequenzähnlichkeit im RdRp verschiedener Viren der Gattung *Umbravirus* im Vergleich mit den neu ermittelten Sequenzen der CMoMV/CMoV-Isolate.

(TBTv, *Tobacco bushy top virus*; GRV, *Groundnut rosette virus*; PEMV, *Pea enation mosaic virus*)

Durch schließen der Lücken mittels spezifischer Primer und Amplifikation der Endbereiche mittels degenerierter umbraviruspezifischer Primer gelang die Sequenzbestimmung des vollständigen kodierenden Bereichs. Unter Verwendung von degenerierten Primer erfolgte auch die Ermittlung der Sequenz des CMoMV aus der von Dr. Falk (University of California, Davis, USA) zur Verfügung gestellten kalifornischen Möhrenprobe.

Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen der RdRp zeigen, dass die Isolate aus Californien und Bingenheim hohe Ähnlichkeiten zum CMoMV aus Australien zeigen und die Isolate aus Belgien und Schottland eher dem CMoV ähnlich sind, wobei das belgische Isolat größere Unterschiede aufweist. Sequenzvergleiche der anderen ORFs zeigten für das kalifornische Isolat Ähnlichkeiten von 96% (ORF 1) und 99% (ORF 3 und 4) zum CMoMV, für das deutsche Isolat von 82% (ORF 1) und 93% (ORF 3 und 4) zum CMoMV (Abb. 7). Auch hieraus ergibt sich eine klare Zuordnung der beiden Isolate zum australischen CMoMV. Das Isolat aus Bingenheim ist der erste Nachweis des CMoMV in Europa, dessen Auftreten bisher nur in Australien und Neuseeland beschrieben ist (Gibbs et al., 1996a). Durch die insgesamt geringen Sequenzähnlichkeiten wird die hohe Sequenzvariabilität dieser beiden Viren deutlich, was den zuverlässigen Nachweis in der RT-PCR mittels universeller Primer erschwert. Letzteres könnte vielleicht eine Erklärung dafür sein, dass CMoMV/CMoV in nur 2 weiteren Proben nachgewiesen werden konnte.

3.3 Carrot thin leaf virus

Das *Carrot thin leaf virus* (CTLV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) wird nicht persistent durch die Blattlausarten *Myzus persicae* und *Cavariella aegopodii* übertragen. Es führt bei Möhre zu verwindeten, schmalen Blättern und Howell und Mink (1980) beschreiben das Vorkommen des CTLV an Möhre im Nord-Westen der USA mit Ertragseinbußen bis 25%. Das Auftreten des CTLV ist in Europa bisher nicht in Möhre beschrieben worden.

Das CTLV wurde von einer Möhrenprobe (Feld Bingenheim, chlorotische Scheckung der Blätter) mechanisch auf *Chenopodium quinoa* übertragen (Lokalläsionen) und ließ sich in elektronemikroskopischen Untersuchungen deutlich mit dem CTLV-Antiserum 1563/6 dekorieren, das erst kürzlich gegen ein Isolat aus Pastinak hergestellt worden war. Mittels virus-spezifischer Primer amplifizierte Sequenzabschnitte zeigten zu der in der Genbank verfügbaren CTLV-Sequenz (AAF80962) im Bereich NlB/Hüllprotein Ähnlichkeiten (Aminosäuresequenz) von 94% und zu einem Isolat aus Pastinak (Vetten, unveröffentlichte Sequenz) 96% und bestätigen somit die serologische Identifizierung. Das CTLV konnte in keiner weiteren Probe mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

CTLV, das sich gut in Lokalläsionen von *Chenopodium quinoa* vermehren lässt, konnte leicht gereinigt und für die Herstellung eines Antiserums verwendet werden. Das CTLV-Antiserum war ELISA-tauglich.

3.4 Carrot yellow leaf virus

Das von Yamashita et al. (1976) als *Carrot yellow leaf virus* (CYLV) beschriebene Virus in Möhre gehört zur Gattung *Closterovirus* (Familie *Closteroviridae*) und ist nach van Dijk und Bos (1989) mit den Vektoren *Cavariella aegopodii* und *C. theobaldi* übertragbar. Es verursacht Chlorosen an Möhrenblättern und ist vermutlich mit dem in der Literatur als HV6 beschriebenen Virus identisch. Die aus der Möhre 11/2001 (Feld Bingenheim, u.a. stark chlorotische Blätter) extrahierte dsRNA zeigte eine Bande mit auffällig hohem Molekulargewicht. Mittels rPCR konnten daraus Klone erhalten werden, die Sequenzähnlichkeiten zu *Closteroviren* zeigen. Die Lücken zwischen den mittels rPCR erhaltenen Klonen wurden mit spezifischen Primern geschlossen, das 3'-Ende über Tailing der entsprechenden cDNA mit dCTP und dGTP bestimmt. Da von dem ursprünglich als CYLV beschriebenen Virus keine Sequenzinformation, Vergleichsmaterial oder Antiserum verfügbar ist, kann die Identität des hier molekular charakterisierten Virus mit dem CYLV nicht überzeugend belegt werden. Die abgeleitete Genomorganisation des CYLV entspricht in der 3'-Hälfte (ab dem HSP70-Gen) der Typspezies *Beet yellows virus* (BYV) (Martelli et al., 2002).

Closteroviren sind dafür bekannt, dass häufig so genannte „defective interfering RNAs“ auftreten, in denen einzelne Genomabschnitte fehlen, sie aber trotzdem repliziert werden und somit in nachweisbaren Konzentrationen vorliegen können (Che et al., 2003). Dies erklärt vermutlich unser Unvermögen, einen Teil des ORF1 und das P6-Gen, welches typischerweise zwischen ORF1 und dem HSP70-Gen liegt, aus der Bingenheim-Probe zu amplifizieren und zu sequenzieren. Ähnliches ist für kein anderes Virus der Gattung *Closterovirus* beschrieben. Eine Überprüfung an weiteren Isolaten des CYLV konnte noch nicht erfolgen, wäre zur Bestätigung der Sequenz jedoch unbedingt notwendig. Vom CYLV wurde mit 11847 Basen ca. 2/3 der gesamten Sequenz inklusive dem vollständigen nicht-translatierten Bereich am 3'-Ende sequenziert.

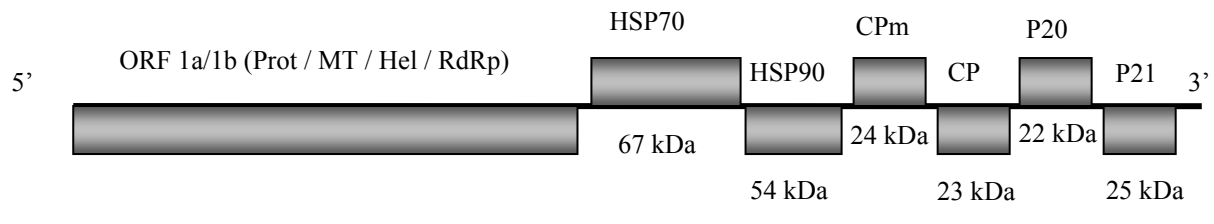


Abb. 8: Genkarte des CYLV in Anlehnung an das BYV

(Prot: Protease, MT: Methyltransferase, Hel: Helikase, RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase, HSP70: Heat shock protein 70 homologes Protein, HSP90: Heat shock protein 90 homologes Protein, CPm: minor coat protein, CP: (major) coat protein, P20: 20 kDa Protein homolog, P21: 21 kDa Protein homolog. Die Molekulargewichte der abgeleiteten Genprodukte sind bis auf das unvollständige ORF 1 unten angegeben.)

Neben der übereinstimmenden Genomorganisation (mit Ausnahme des ungeklärten Übergangs vom ORF 1 zum P6) zeigte das CYLV auch die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu den Viren der Gattung *Closterovirus*. So hat das HSP70, welches in der Regel zur Darstellung von Verwandtschaftsbeziehungen der Viren der Familie *Closteroviridae* herangezogen wird, die höchsten Sequenzähnlichkeiten mit 49% und 48% zum *Beet yellow stunt virus* (BYSV) und *Beet yellows virus* (BYV), das CPm mit jeweils 36% zum BYSV und BYV und das CP mit jeweils 28% zum BYSV und *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2).

Die phylogenetische Verwandtschaft wird durch den in der Abb. 9 dargestellten Baum verdeutlicht. Das CYLV ist im Cluster I der Gattung *Closterovirus* eingeordnet.

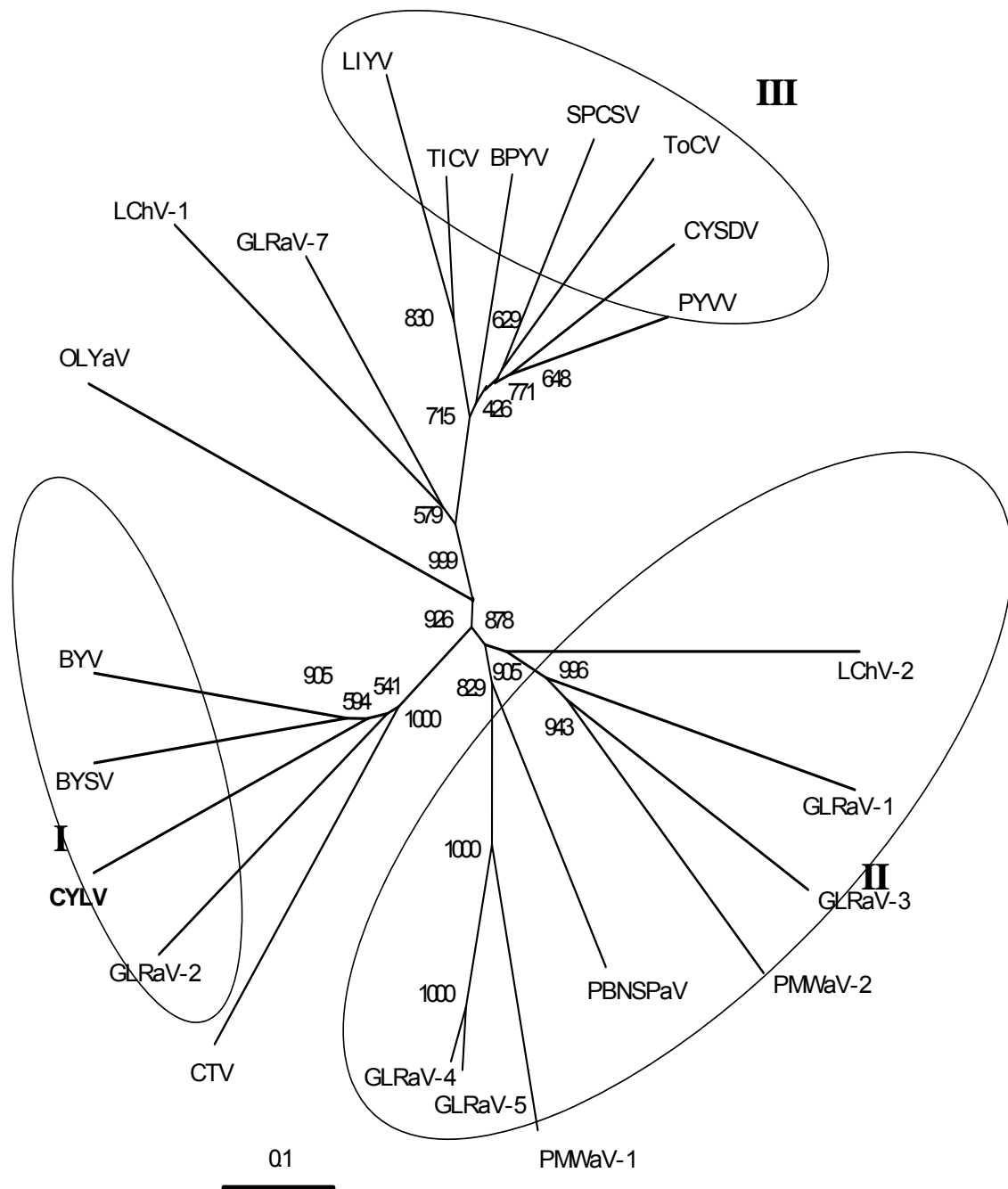


Abb. 9: Phylogenetischer Baum des HSP70-Proteins der Viren der Familie *Closteroviridae*

(I: Gattung *Closterovirus*, II: Gattung *Ampelovirus*, III: Gattung *Crinivirus*, die Zweiglängen sind proportional zu den verwandtschaftlichen Distanzen der Sequenzen, die Zahlen an den Knotenpunkten geben die Bootstrap Werte von 1000 Wiederholungen an. GLRaV-7, OLYaV und LChV-1 sind keiner Gattung der Familie *Closteroviridae* zugeordnet. LIYV: *Lettuce infectious yellows virus*, TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*, BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*, SPCSV: *Sweet potato chlorotic stunt virus*, ToCV: *Tomato chlorosis virus*, CYSDV: *Curcubit yellow stunting disorder virus*, PYVV: *Potato yellow vein virus*, LChV-1 - 2: *Little cherry virus-1 - 2*, GLRaV-1 - 7: *Grapevine leafroll associated virus -1 - 7*, PBNSPaV: *Plum bark necrosis and stem pitting-associated virus*, CTV: *Citrus tristeza virus*, BYSV: *Beet yellow stunt virus*, BYV: *Beet yellows virus*, OLYaV: *Olive leaf yellowing-associated virus*)

Das Hüllprotein des CYLV wurde bakteriell exprimiert. Das nach Immunisierung eines Kaninchens erhaltene Antiserum (1613/2) wurde gegen Möhren-Probe 15 aus Feld Hebenshausen (die einzige in der RT-PCR CYLV-positive Probe) in ISEM und Dekoration getestet. Im ISEM zeigte sich im Vergleich zu einem Tropfpräparat eine deutliche Anreicherung von Closterovirus-ähnlichen Partikeln. Darüber hinaus wurden die Viruspartikel durch das Antiserum bis auf einen kurzen terminalen Abschnitt, der aus dem CPM aufgebaut ist, dekoriert (Abb. 10). Das Antiserum hat somit seine prinzipielle Antigen-bindende Eigenschaft gezeigt und muss für weitere Anwendungen in serologischen Nachweisverfahren (z.B. ELISA) auf seine Spezifität hin überprüft werden, was aufgrund des späten Zeitpunktes der Identifizierung der ersten CYLV-infizierten Pflanze (Dezember 2003) nicht mehr möglich war. Das mittels RT-PCR amplifizierte CP-Gen aus der Möhrenprobe Hebenshausen (Probe 15) wurde sequenziert und die resultierende Aminosäuresequenz zeigte eine Ähnlichkeit von 98% zum Isolat aus Bingenheim.

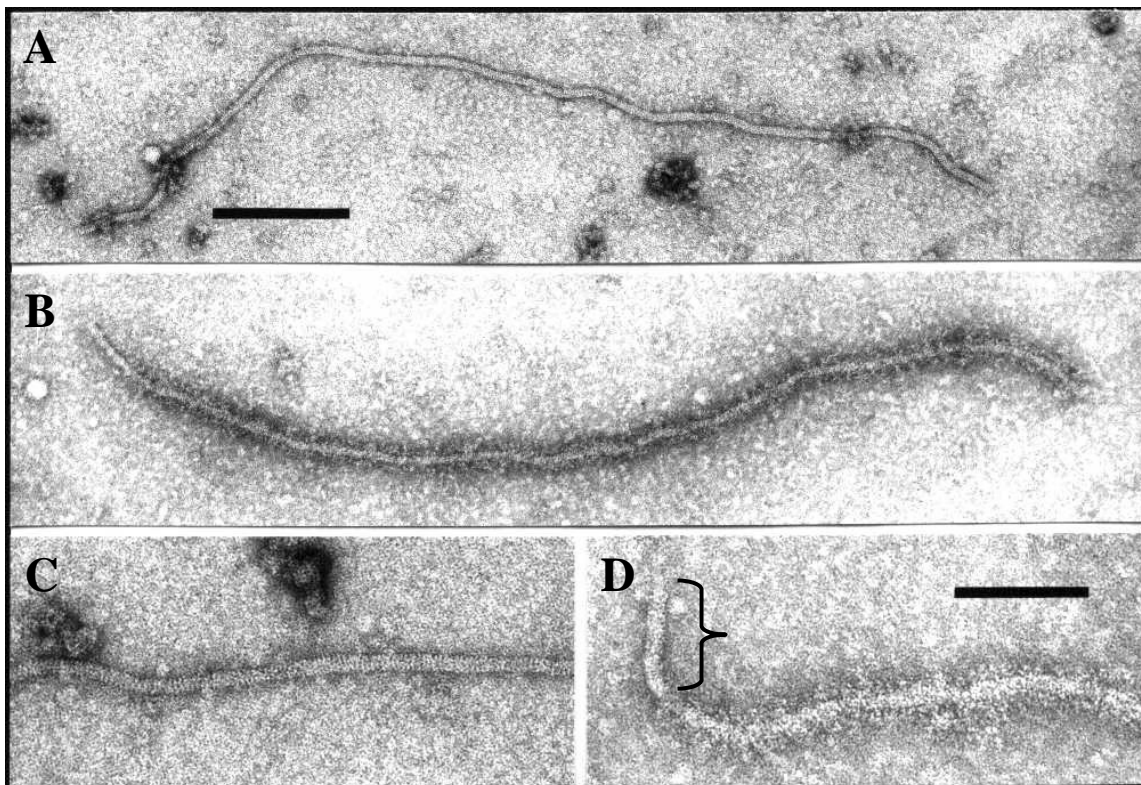


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CYLV-Partikeln

(A: undekoriertes Partikel bei 104.000-facher Vergrößerung, Größenstandard 100 nm; B: mit CP-spezifischen Antikörper „dekoriertes“ Partikel, von dem ein Ende jedoch „undekoriert“ bleibt, weil das Antiserum keine Antikörper gegen CPM enthält; C: ein 200.000-fach vergrößertes Partikel, an dem die Closterovirus-typische „Querstreifung“ sichtbar wird; D: Detailvergrößerung des durch das CPM gebildeten, undekorierten Endes des CYLV-Partikels (das nicht-dekorierte Ende von ca. 100 nm ist gekennzeichnet)

Westernblot-Versuche mit der Möhrenprobe Hebenshausen ergaben ebenfalls sehr spezifische Reaktionen nur mit closterovirusinfizierten, nicht aber mit gesunden Blattproben, d.h. nur in der closterovirusinfizierten Blattprobe wurde eine Bande von ca. 25 kDa und 2 degradierte Banden von 20 und 22 kDa sichtbar. Aus einer freundlicherweise von René van der Vlugt, Wageningen, NL, zur Verfügung gestellten Blattprobe, die eine niederländische Herkunft des

CYLV enthalten sollte, gelang in keinem Falle die PCR-Amplifizierung von CYLV-Sequenzen. Im Westernblot wurden jedoch mit der niederländischen Probe Banden von ca. 22 kDa erhalten, die darauf hindeuten, dass die deutschen Closterovirusisolate mit der niederländischen CYLV-Herkunft serologisch eng verwandt sind und damit CYLV-Isolate darstellen.

Erste Ergebnisse zum CYLV wurden auf der Tagung des DPG (Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft)-Arbeitskreises Pflanzenvirologie im Jahre 2003 und 2004 vorgestellt (Menzel und Vetten, 2003).

3.5 Parsnip yellow fleck virus

Vom *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV, *Sequivirus*, *Sequiviridae*) sind zwei Serotypen bekannt (der Anthriscus- und Parsnip-Serotyp), die experimentell beide Möhre infizieren können, von denen aber nur der Anthriscus-Serotyp in natürlich infizierten Möhren bisher gefunden wurde (van Dijk und Bos, 1989). Der Anthriscus-Serotyp des PYFV, der auf der Wildpflanze *Anthriscus sylvestris* verbreitet vorkommt, wurde in den Niederlanden als Ursache für das Absterben von jungen Pflanzen von Möhren, Koriander und Dill identifiziert (van Dijk und Bos, 1985). Auch in Großbritannien ist das zeitweise massenhafte Auftreten des Virus beschrieben, was im Jahr 1998 zu Ertragseinbußen von 30% geführt hat (Murant, 2003). Das Virus wird in Abhängigkeit des Helfervirus *Anthriscus yellows virus* (AYV, *Waikavirus*, *Sequiviridae*) durch die Blattlausarten *Cavariella aegopodii*, *C. pastinacae* und *C. theobaldi* semi-persistent übertragen. Da die Möhre für das AYV keine Wirtspflanze ist, kann das PYFV nicht mehr von Möhre zu Möhre übertragen werden, es sei denn die Laus hat kurz zuvor an einer AYV-infizierten Pflanze gesaugt (Elnagar und Murant, 1976). Da bei Infektion von jungen Möhren die Pflanzen absterben und überwachsen werden, war die Ermittlung der tatsächlichen Häufigkeit des Auftretens des PYFV aus den in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen nicht möglich, da die Proben überwiegend in späteren Entwicklungsstadien der Möhren genommen wurden. Auffällige Ausfälle von Jungpflanzen in Zählstrecken in Untersuchungsstandort Hassel wurden von Arbeitsgruppe B jedoch nicht festgestellt (vergl. 4.2.6., S. 48).

Das Virus wurde von einer Möhrenprobe mit starker Blattrötung mechanisch auf *Nicotiana benthamiana*, *Ammi majus* und *Coriandrum sativum* übertragen und ließ sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit dem PYFV-Antiserum 610/14 (Anthriscus-Serotyp) stark dekorieren, nur schwach dagegen mit dem Antiserum gegen den Parsnip-Serotyp und gehört somit vermutlich zum Anthriscus-Serotyp. Sequenzvergleiche von 2 Klonen im Bereich der RdRp, die aus extrahierter dsRNA gewonnen wurden, zeigen Sequenzähnlichkeiten (Aminosäuresequenz) von 77% und 90% zur PYFV-Sequenz des Parsnip-Serotyps (Accession Nr. D14066). Vom Anthriscus-Serotyp sind keine Sequenzinformationen verfügbar. Ferner wurde das PYFV in einer Kälberkropf-Pflanze vom Rand des Möhrenfeldes in Neunkirchen mittels RT-PCR nachgewiesen.

3.6 „Beny“-Virus

Aus der dsRNA der Möhre 11/2001 (Feld Bingenheim) konnten mittels rPCR Klone erhalten werden, deren translatierte Sequenz Ähnlichkeiten zu RdRp-Proteinen von Viren der Gattungen *Benyvirus* und *Hepevirus* zeigen. Die Lücken zwischen den mittels rPCR erhaltenen Klonen wurden mit spezifischen Primern geschlossen, der am 3'-Ende lokalisierte Bereich wurde mittels eines spezifischen sense Primers und eines Oligo(dT)-Primers amplifiziert. Die beiden bisher molekular charakterisierten Viren der Gattung *Benyvirus*, *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV, Erreger der Rhizomania Krankheit der Zuckerrübe) und *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), besitzen ein 4- bzw. 5-teiliges Genom, stäbchenförmige Partikel und

werden durch den Bodenzpilz *Polymyxa betae* übertragen (Koenig und Lesemann, 2001). Die höchsten Sequenzähnlichkeiten im Bereich der Replikase (Methyltransferase, Helikase, RdRp) zeigen die Benyviren zu Viren der Gattungen *Hepevirus* und *Rubivirus*, die ausschließlich Wirbeltiere infizieren und isometrische Partikel haben, nicht aber zu Pflanzen infizierenden Viren. Die Viren unterscheiden sich jedoch deutlich in Ihrer Genomorganisation. Die größte RNA der Benyviren, die RNA 1, besitzt nur ein ORF, welches für eine Replikase kodiert. Die Hepeviren und Rubiviren besitzen hingegen nur eine RNA, auf der 2 oder 3 ORFs liegen (Green et al., 2001).

In der RdRp des Replikasegens zeigt das neu entdeckte, in Möhren vorkommende Virus zu den Benyviren zwar die höchsten Sequenzähnlichkeiten von je 42%, mit *Swine hepatitis E virus* (SHEV) und *Hepatitis E virus* (HEV) jedoch lediglich 19% bzw. 18%. Da es aber auf der sequenzierten RNA drei mögliche ORFs besitzt, zeigt es in der Genomorganisation deutliche Ähnlichkeiten zu den Hepeviren. Die Genprodukte der möglichen ORF 2 und 3 zeigten bei Sequenzvergleichen mit den Benyviren und Hepeviren sowie generell den Sequenzen der Genbank (NCBI) keine signifikanten Ähnlichkeiten. Ob es sich bei dem ORF 3 analog den Hepeviren um ein Hüllprotein handelt, ist unklar. Von der RNA des neuen Virus wurden bisher 7,2 kb einschließlich des vollständigen 3'-Endes sequenziert. Der nicht-translatierte Bereich am 5'-Ende und ein kurzer N-terminaler Abschnitt des Replikasegens sind noch unbekannt, es konnten aber alle konservierten Motive der Methyltransferase, Helikase und RdRp identifiziert werden (Koonin et al., 1992). Wenn man davon ausgeht, dass vor dem Replikase-ORF kein weiterer ORF liegt, so wäre bei einer den Beny- oder Hepevirus-ähnlichen Struktur eine Genomgröße von ca. 8 kb zu erwarten.

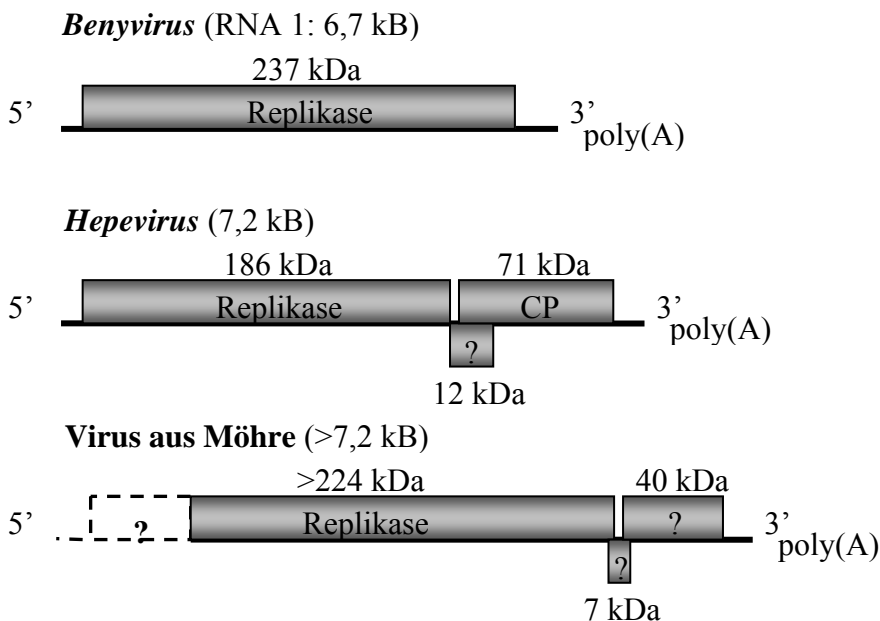


Abb. 11: Genomorganisation des neuen Möhrenvirus im Vergleich zu Beny- und Hepeviren (Die Molekulargewichte der ORFs sind angegeben.)

40 Ergebnisse der Arbeitsgruppe A:

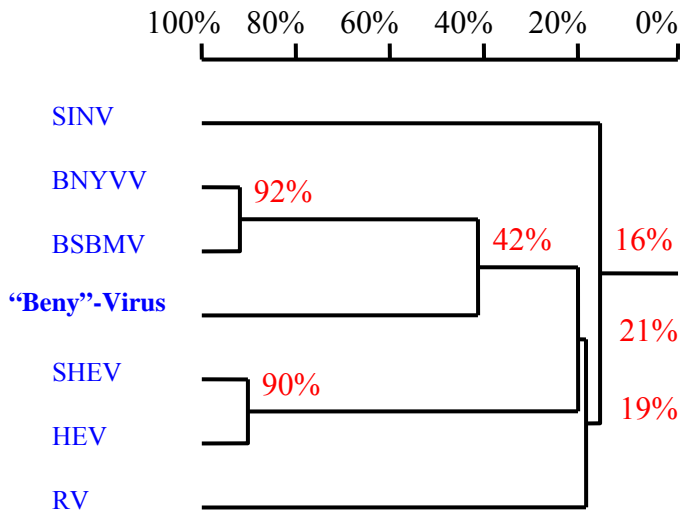


Abb. 12: Sequenzvergleich der RdRps verschiedener Viren der Gattungen *Benyvirus*, *Hepevirus*, der Familie *Togaviridae* und des neuen Virus aus Möhre („Beny“-Virus)

(RV: *Rubella virus*, SINV: *Sindbis virus*, HEV: *Hepatitis E virus*, SHEV: *Swine hepatitis E virus*, BNYVV: *Beet necrotic yellow vein virus*, BSBMV: *Beet soil-borne mosaic virus*)

Da das neue Möhrenvirus nur geringe Sequenzähnlichkeit (42%) mit den Benyviren (diese haben untereinander dagegen eine RdRp-Ähnlichkeit von 92%) und eine für Pflanzenviren ungewöhnliche Genomorganisation aufweist, kann es keiner bekannten Virusgattung zugeordnet werden.

Ob das Genom dieses Virus weitere RNAs umfasst und wie das Virus unter natürlichen und experimentellen Bedingungen übertragen werden kann, ist bisher unbekannt. Versuche zur mechanischen Übertragung auf Testpflanzen blieben ohne Ergebnis. Des Weiteren war es in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von infiziertem Pflanzenmaterial nicht möglich, virusähnliche Partikel sichtbar zu machen. Versuche zur Expression des vermeintlichen Hüllproteins im Hinblick auf die Herstellung eines Antiserums scheiterten ebenfalls.

Das Virus wurde im Verlauf der Untersuchungen in sehr vielen Proben unterschiedlicher Herkünfte in Deutschland (Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Hessen) mittels spezifischer Primer in der RT-PCR nachgewiesen und scheint somit weit verbreitet und häufig zu sein. Rückschlüsse auf die Symptome oder wirtschaftliche Bedeutung dieses bisher nicht bekannten Virus können leider nicht gezogen werden, da es auch in zahlreichen symptomlosen Pflanzen nachgewiesen werden konnte (vergl. Pkt. 6.2.1.1, S. 66). Einzelne Pflanzen in denen außer diesem kein weiteres Virus nachgewiesen werden konnte, zeigten eine starke Verzweigung sowohl des Rübenkörpers als auch des Blattschopfes.

3.7 Carlavirus

Aus der dsRNA der Möhre 11/2001 (Feld Bingenheim) konnte mittels rPCR ein Klon erhalten werden, der Sequenzähnlichkeiten zu den Triple-Gene-Block(TGB)-Proteinen zeigt. In diesem Klon ist das TGB-Protein 1 teilweise, die TGB Proteine 2 und 3 vollständig enthalten. Eine Reihe von Pflanzenvirusgattungen besitzt TGB-Proteine, welche an der Virusausbreitung in der Pflanze beteiligt sind, die sich aber unter anderem in der Größe des TGB 3, An-

zahl sowie Lage der hydrophoben Transmembranbereiche des TGB 3 in Gruppen einteilen lassen (Morozov und Solovyev, 2003). Die Klonsequenz erlaubte eine eindeutige Zuordnung des Möhrenvirus zu einer Gruppe, die die Gattungen *Potex*-, *Carla*-, *Allexi*- und *Foveavirus* umfasst, die alle am 3'-Ende polyadenyliert sind. Die Lücke zur Bestimmung der am 3'-Ende lokalisierten Gene des Hüllproteins (CP) und des letzten ORF, welches vermutlich für ein Nukleinsäure-bindendes Protein (NABP) kodiert, wurde mittels eines spezifischen sense Primers und Oligo(dT)-Primers geschlossen. Die ermittelte Sequenz hat eine Gesamtlänge von 2235 Basen ohne den Poly(A)-Schwanz. Die abgeleitete Hüllproteinsequenz zeigte größte Ähnlichkeiten zu Viren der Gattung *Carlavirus*, dem *Poplar mosaic virus* (43%), *Cole latent virus* (38%) und *Shallot latent virus* (37%). In der Gattung *Carlavirus* sind 2 vorläufige Arten (*Anthriscus latent virus* und *Arracacha latent virus*) beschrieben, die in Umbelliferen vorkommen (Brunt et al., 2001). Inwieweit diese in Zusammenhang mit dem hier teilsequenzierten Virus aus Möhre stehen, kann aufgrund nicht-verfügbarer Sequenzen und Vergleichsmaterials nicht geklärt werden. Für die meisten Viren der Gattung *Carlavirus* fungieren verschiedene Blattlausarten als Vektoren. Das Carlavirus konnte mittels RT-PCR in einer weiteren Probe (Garten in Weddel) nachgewiesen werden, der Sequenzvergleich des amplifizierten N-terminalen Teils des Hüllproteins ergab eine Sequenzähnlichkeit von 99%.

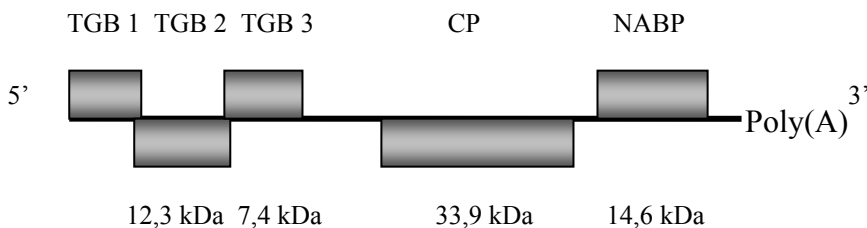


Abb. 13: Organisation der 3'-Hälfte des Genoms des neuen Carlavirus

(Die Molekulargewichte der abgeleiteten Genprodukte sind unten angegeben.)

42 Ergebnisse der Arbeitsgruppe A:

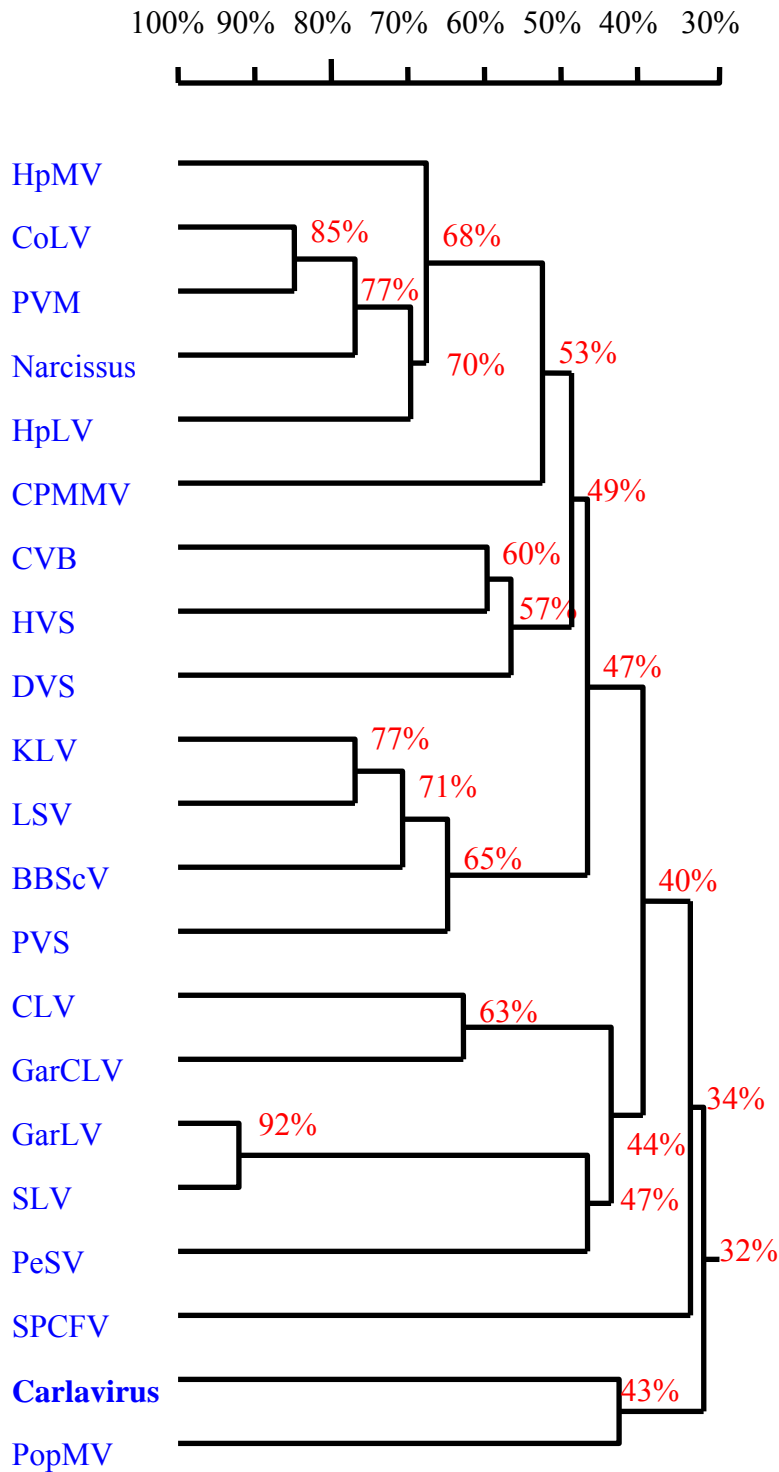


Abb. 14: Aminosäuresequenzähnlichkeiten in den Hüllproteinen verschiedener Viren der Gattung *Carlavirus* im Vergleich mit dem neuen *Carlavirus* aus Möhre:

(Das GarLV und SLV werden heute als eine Virusspezies angesehen. HpMV: *Hop mosaic virus*, CoLV: *Columnea latent virus*, PVM: *Potato virus M*, Narcissus: *Narcissus Carlavirus*, HpLV: *Hop latent virus*, CPMMV: *Cowpea mild mottle virus*, CVB: *Chrysanthemum virus B*, HVS: *Helenium virus S*, DVS: *Daphne virus S*, KLV: *Kalanchoe latent virus*, LSV: *Lily symptomless virus*, BBScV: *Blueberry scorch virus*, PVS: *Potato virus S*, CLV: *Carnation latent virus*, GarCLV: *Garlic common latent virus*, GarLV: *Garlic latent virus*, SLV: *Shallot latent virus*, PeSV: *Pea streak virus*, SPCFV: *Sweetpotato chlorotic fleck virus*, PopMV: *Poplar mosaic virus*)

3.8 dsRNA-Viren

Aus den dsRNA-Präparaten von 2 verschiedenen symptomtragenden Möhren und den mittels Blattlausübertragung mit dem CtRLV aus Möhre (Hassel) infizierten Möhren wurden mittels rPCR Sequenzen erhalten, die deutliche Ähnlichkeiten zu Viren verschiedener Gattungen mit dsRNA-Genom zeigen.

Die Aminosäuresequenz des Klons von dsRNA-Virus I zeigt die höchste Ähnlichkeit mit ca. 80% zum *Heterobasidion annosum virus* (*Partitivirus*, *Partitiviridae*), einem latent im Rotfäulepilz der Gehölze vorkommenden Virus. Die im Gewächshaus kultivierten Möhren waren symptomlos und das dsRNA-Präparat zeigte, neben anderen schwächeren, eine prominente Bande von ca. 2,6 kbp. Die Teilsequenz von dsRNA-Virus II zeigt die höchsten Ähnlichkeiten mit ca. 40% zu *Helicobasidium mompa virus* (*Totivirus*, *Totiviridae*) und *Oyster mushroom isometric virus* II (unklassifiziertes dsRNA-Virus), ebenfalls zwei Pilze infizierenden Viren. Es handelt sich hierbei um die Möhre 11/2001 (Feld Bingenheim) in der auch das CYLV, CtRLV, CMoMV, „Beny“-Virus und Carlavirus nachgewiesen konnten. Die Teilsequenz von dsRNA Virus III zeigt hohe Ähnlichkeit mit ca. 70% zum *Saccharomyces cervisiae virus* (*Totivirus*, *Totiviridae*), einem Hefe infizierendem dsRNA-Virus. Diese Möhre (Feld Drantum) zeigte stark gerötete Blattränder und die dsRNA hatte eine Größe von ca. 5,5 kbp. Alle Sequenzen liegen im Bereich der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) des jeweiligen Virus.

Von den Viren der Familie *Partitiviridae* und *Totiviridae* ist bekannt, dass sie keine natürlichen Vektoren besitzen, nicht mechanisch übertragbar sind und sich durch Zellteilung intrazellulär ausbreiten. Die Pilz infizierenden Viren werden zusätzlich durch Sporogenese, die Pflanzen infizierenden im hohen Maße durch Samen übertragen. Über die tatsächliche wirtschaftliche Bedeutung (Ertragsminderung) dieser Pflanzenviren der Familie *Partitiviridae* ist bis heute nur wenig bekannt, sie wird aber als sehr gering eingeschätzt, da die Pflanzen in der Regel symptomlos bleiben.

Die Pflanzen, aus denen die dsRNA isoliert wurde, schienen rein äußerlich nicht von Pilzen infiziert zu sein. Dass es sich bei den Viren tatsächlich um Möhren infizierende Viren handelt, kann aber nicht eindeutig festgestellt werden, da keine Untersuchungen zu eventuell vorliegenden endogenen Pilzinfektionen vorgenommen wurden. In der Familie *Partitiviridae* sind 4 verschiedene in Möhre vorkommende Viren beschrieben, von denen leider keine Sequenzinformationen oder Seren für vergleichende Untersuchungen vorlagen. Die Sequenzähnlichkeiten zwischen den Viren der Familie *Partitiviridae* sind teilweise in bestimmten Genomabschnitten relativ hoch, so dass alleine anhand der erhaltenen Sequenzen keine Zuordnung in eine Gattung vorgenommen werden sollte. Inwieweit diese Viren, so sie Möhren infizieren können, an der Symptomausprägung beteiligt sind, kann nicht abgeleitet werden.

4 Material und Methoden Arbeitsgruppe B: Status Quo Analysen, Strategien und Lösungsansätze

4.1 Versuchsaufbau

Die Feldversuche wurden a) in der niedersächsischen Hauptproblemregion (Standort Hassel) und b) als Parzellenversuch für beobachtungsintensive Fragestellungen auf dem universitätseigenen Versuchsbetrieb Neu-Eichenberg/Hebenschhausen angelegt. Die jew. Anbaumaßnahmen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Anbaumaßnahmen an den Standorten Hassel 2002 und 2003 und Hebenschhausen 2003

	Hassel 2002	Hassel 2003	Hebenschhausen 2003
Vorfrucht	Sommergerste	Grasvermehrung	Klee gras
Bodenbearbeitung	Pflug	Pflug	Kreiselegge
Aussaattermin	03.05.	15.04.	16.04. / 12.05.
Aussaatechnik	pneum., Einzelkorn	pneum., Einzelkorn	Mini Nibex
Aussaatmenge	70 Pfl./m ²	180 Pfl./m ²	180 Pfl./m ²
Reihenabstand	50 cm	32 cm	35 cm
Pflegetechnik	Abflammgerät	Abflammgerät	Hacke

4.1.1 Standort Hassel 2002, 2003

Die Versuchsanstellung am Standort Hassel zielte in beiden Versuchsjahren sowohl im Vorprojekt (Rau & Buck 2003), als auch im Vorhaben des Bundesprogramms, auf die Klärung des Einflusses unterschiedlich abreifender Sorten (Verarbeitung/Frischmarkt) und Infektionszeitpunkte (früh bzw. spät) auf das vermutete Infektionsgeschehen bei Möhrenviren durch die Gierschblattlaus. Beide Flächen gehören zum Betrieb Kramer in Hassel und waren ca. 1,5 km voneinander entfernt.

In beiden Jahren handelte es sich um eine zweifaktorielle Versuchsanlage (Faktoren Sorte und Vliesabdeckung) in Form einer Spaltanlage (vergl. Abb. 15, 16, 17).

2002 In einen Praxisschlag (1 ha) der Verarbeitungssorte Kameran (180 Tage) wurden 3 m breite Streifen der Frischmarktsorten Bolero und Nevis (120-Tage) integriert. Mit dem Ziel vektorvermittelte Neuinfektionen auszugrenzen, erfolgten am 15.3. partielle Netzabdeckungen (Rantais-48, Erdflohnetz, Schachtrupp) von 3 x 6m über beide Sorten (Bolero/Kameran, Nevis/Kameran) ca. eine Woche vor dem zu erwartenden Vektorflug. Die Streifen hatten einen Abstand von 10 m untereinander und die Netzabdeckungen einen Mindestabstand von 13 m zum Feldrand.



Abb. 15: Netzabdeckung, Hassel 2002

Die aufgelegten Netzstreifen wurden dann sukzessive im ca. 14-tägigen Abstand am 29.5./11.6./28.6./12.7./18.7. & 27.7. entfernt (vergl. Abb. 15). Die Flugaktivität von Blattläusen wurde mit der Aufstellung zweier Gelbschalen, ca. 5m vom Bestandesrand, mit jew. zwei Leerungsterminen pro Woche erfasst. Die Entwicklung der Blattlauspopulationen im Bestand wurde in fest markierten Zählstrecken, 2 x 2 m je Sorte, als verbundene Stichprobe ca. 14-tägig bonitiert.

Die Ertragshebung am 1.10. wurde mittels zweier jew. 1,5 m langer Erntestrecken pro Parzelle (Fleck et al. 2002) auf dt/ha extrapoliert. Am 15.10. erfolgte die Einlagerung einer Auswahl der geernteten Rüben in Neueichenberg (Standort der Universität Kassel). Symptomtragende Rübenkörper wurden als Infektorpflanzen für den Feldversuch in Hebenshausen 2003 eingesetzt, bzw. dienen als Ausgangsmaterial der Virusanalyse durch die Arbeitsgruppe Veten an der BBA Braunschweig.

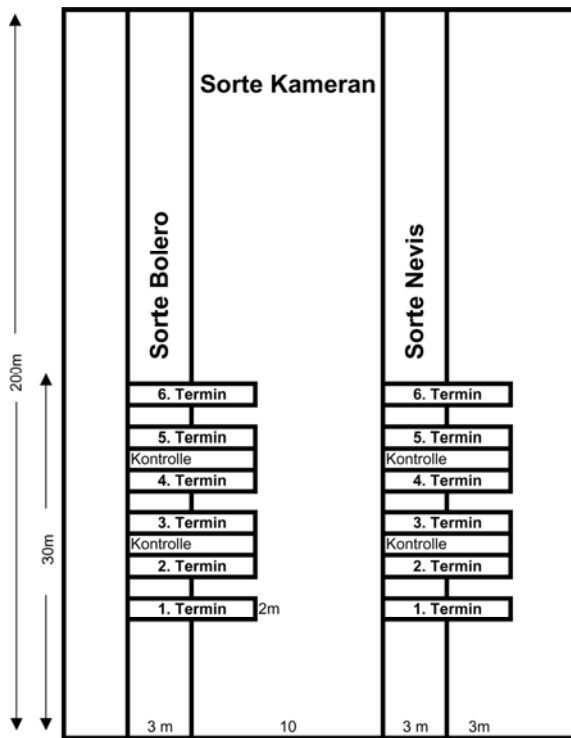


Abb. 16: Versuchsplan Hassel 2002

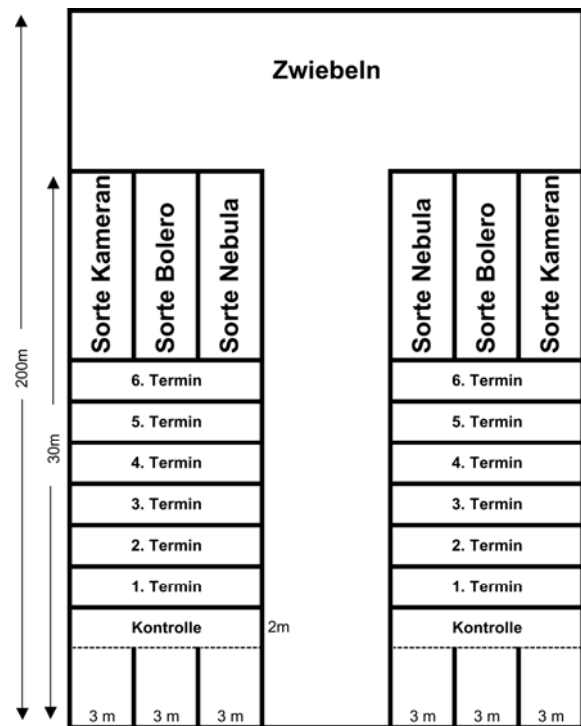


Abb. 17: Versuchsplan Hassel 2003

2003

Im Jahr 2003 wurde am 28.4. das Erdflornetz des Vorjahres mit feinerem Vliesmaterial (Agryl P10 Plus, Rijk Zwaan) ersetzt, um ein Eindringen von Blattläusen möglichst gänzlich ausschließen zu können. Je Variante wurden zwei Wiederholungen mit einer Parzellengröße von 3 x 2m angelegt. Die Sorte Nevis wurde aus betrieblichen Gründen durch die ebenfalls praxisübliche Sorte Nebula (120 Tage) ersetzt (vergl. Abb. 16).

Die Probenahmen, Vliesaufdeckungen und Bonituren für das Jahr 2003 sind Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Termine der Feldbeprobungen am Standort Hassel 2003

	15.04.	06.05.	12.05.	19.05.	21.05.	26.05.	02.06.	06.06.	12.06.	16.06.	20.06.	24.06.	27.06.	03.07.	04.07.	11.07.	13.07.	16.07.	17.07.	18.07.	21.07.	22.07.	25.07.	31.07.	01.08.	04.08.	05.08.	08.08.	25.80.	05.09.	16.09.	
Vliesaufdeckung	X			X		X				X				X					X		X											
Blattlausflug	X	X	X			X	X	X		X	X			X	X				X				X	X				X				
Blattläuse im Bestand		X	X	X				X				X			X				X													
Krankheiten im Bestand															X				X							X			X	X	X	
Einzelpflanzenmonitoring															X						X			X			X		X	X	X	

In diesem Jahr wurde zusätzlich ein durchgehendes Monitoring markierter symptomtragender Pflanzen durchgeführt. Die Entwicklung weiterer Krankheiten im Bestand, insb. *Alternaria* sp., wurde bonitiert. Die Vliesabdeckung der Parzellen fand am 28.4., die Ertragshebung am 17.9. statt. Die Einwinterung von Teilproben in Neueichenberg für spätere Virusanalysen erfolgte am 1.10.04.

4.1.2 Standort Hebenshausen 2003

Dem Einfluss unterschiedlicher Saattermine auf den Anteil symptomtragender Pflanzen wurde am Standort Hebenshausen in Nord-Hessen nachgegangen. Die Sorten Kameran und Bolero wurden zu 2 Terminen (früh/spät) in einer vollrandomisierten Blockanlage (Parzellengröße 3,3 x 1,5 m) mit 4 Wiederholungen kombiniert (Abb. 18).

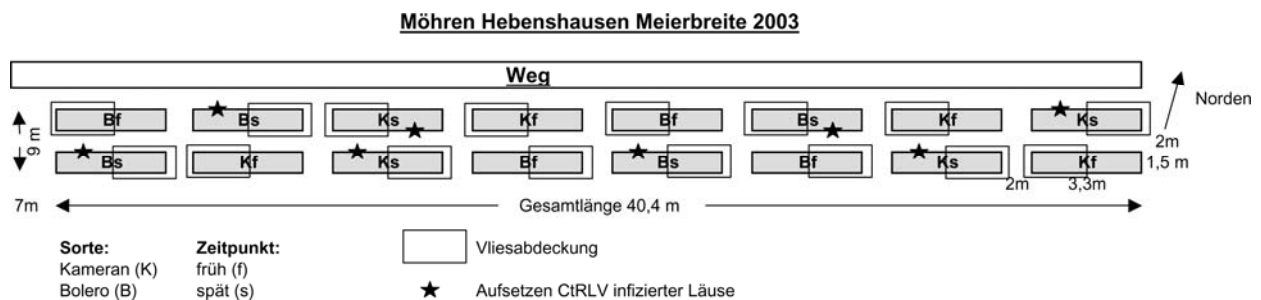


Abb. 18: Versuchsplan Hebenshausen 2003

Während des Zeitraumes vom 14.05. bis 25.06. blieb die Hälfte jeder Parzelle mit einem Vlies (Agryl P10 Plus, Rijk Zwaan) abgedeckt (Spaltanlage). Aufgrund ungewöhnlich langanhaltender Trockenheit zur Zeit des Auflaufens mussten der frühe Termin der Sorte Bolero am 14.05. und die späten Termine von Bolero und Kameran am 11.06. nachgesät werden. Am 13.05. erfolgte das Einbringen von 20 Infektorpflanzen aus dem Ökoring-Versuch Hassel 2002 in die beiden Mittelreihen. Am 25.7. wurden von diesen Pflanzen Blattproben entnommen, eingefroren und zur Analyse der BBA Braunschweig übergeben. Die Beerntung erfolgte am 29.09. Ausgewählte Infektorpflanzen wurden am 1.10.2004 für Versuche im Folgejahr frostfrei eingewintert. Die jew. Feldbeprobungen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Termine der Feldbeprobungen am Standort Hebenshausen

	28.04.	29.04.	06.05.	13.05.	20.05.	27.05.	28.05.	02.06.	04.06.	06.06.	11.06.	12.06.	18.06.	19.06.	25.06.	26.06.	02.07.	09.07.	10.07.	15.07.	16.07.	22.07.	25.07.	07.08.	21.08.	04.09.	16.09.	29.09.	
Vliesaufdeckung															X														
Blattlausflug	X	X	X	X	X	X		X		X		X	X		X		X	X			X	X							
Blattläuse im Bestand							X		X		X			X		X				X				X					
Krankheiten im Bestand																										X	X	X	X
Einzelpflanzenmonitoring																									X	X	X	X	

Zusätzlich wurde der Versuch unternommen ausgewählte Jungpflanzen mit infektiösen Blattläusen zu besetzen, um so gezielt Neuinfektionen unter Feldbedingungen mit entsprechenden Nachtestungen herbeizuführen und dokumentieren zu können. Dazu wurden am 9.07. auf jeweils 5 hintereinanderliegende markierte Pflanzen Blattläuse aufgesetzt, mind. 3/Pflanze und Parzelle, die auf einer an der BBA Braunschweig CtRLV-positiv getesteten Pflanze (Isolat Hassel) angezogen waren. Der Ansiedelungsverlauf wurde über Bonituren der Kolonieentwicklung am 10. und 25.07. kontrolliert (vergl. Tab 3).

4.2 Datenerhebung

4.2.1 Bonituren der Haupt- und Nebenwirte auf Cavariella- und Virusbesatz

Bei der vektorvermittelten Übertragung von Viruskrankheiten können Schlagdistanzen und die Winterüberbrückung über Haupt- und Nebenwirte eine wichtige Rolle spielen. Deshalb wurden ab dem 24. April Haupt- (Weidenbestände) und potentielle Sommer-Nebenwirte (Kerbel, Kälberkropf u.a.) des Virusvektors *Cavariella aegopodii* in der engeren Umgebung der Versuchsstandorte in Hassel regelmäßig auf Blattlausbesatz kontrolliert. Im Laufe der Vegetationsperiode wurden am (21.05., 5.08. und 25.08. stichprobenartig Blattmaterial von Wildumbelliferen gesammelt und auf das Spektrum nachgewiesener Virose getestet. Einige ausgewählte Pflanzen aus dem Feld wurden bis zum Projektende zur weiteren Beobachtung der Symptomentwicklung im Forschungsgewächshaus der Universität Kassel kultiviert.

4.2.2 Blattlausbonituren an Möhrenpflanzen

In den Versuchspartellen wurde die Populationsentwicklung von Blattläusen im Möhrenbestand in zweiwöchentlichem Turnus als verbundene Stichprobe in Zählstrecken von jeweils 10 Pflanzen pro Parzelle bonitiert. Nachbestimmungen der vorgefundenen Arten ergaben, dass es sich praktisch ausschliesslich um *C. aegopodii* – Kolonien handelte, welche sehr leicht am Besiedelungsbild der Fiederblätter von der nur sehr sporadisch anzutreffenden Schwarzen Bohnenlaus *A. fabae* zu unterscheiden waren. Es wurden pro Pflanze alate und aptere *C. aegopodii*-Formen und mumifizierte Individuen gezählt. Im Zuge dieser Bonituren wurden weitere Schaderreger, wie Möhrenblattfloh (*Trioza apicalis*) u.a., soweit sie in relevanten Abundanzen auftraten, miterfasst.

4.2.3 Erfassung der Blattlaus-Flugaktivität mittels Gelbschalen

Die Flugaktivität des vermuteten Hauptvektors *Cavariella aegopodii* wurde an jeder Versuchsfläche mit einer praxisüblichen Gelbschale, gefüllt mit Wasser und Entspannungsmittel, in West-Südwest-Richtung (Hauptwindrichtung) aufgestellt, im wöchentlichem Turnus überwacht. Die jew. Fänge wurden in 70%-igem Ethanol konserviert, gefangene Gesamtaphiden wurden von Beifängen getrennt, gezählt und auf Artniveau bestimmt. Die Artenbestimmung erfolgte nach MÜLLER (1975), HEIE (div. Jg.) und TAYLOR (1984).

4.2.4 Survey 2003

Ein erstes Auftreten symptomtragender Pflanzen auf den Praxisflächen in Niedersachsen konnte ab dem 4. August festgestellt werden. Die Lage der Betriebe in der Region südlich Bremen ist Abschnitt 4.2.4 zu entnehmen. Am 25. August wurden auf 5 Betrieben von jew. 20 Pflanzen (jeweils 10 symptomlose und 10 symptomtragende) eine Blattprobe entnommen und für den späteren Zugriff zur Ernteentnahme markiert. Diese wurden an der BBA Braunschweig mittels PCR und Immunelektronenmikroskopie (ISEM) auf vorhandene Viruspartikel untersucht (siehe 2.19, S. 23).

Am 16. September wurden die markierten Pflanzen geerntet und bonitiert (siehe 4.2.6). Aus Erntestrecken von 2 Metern pro Schlag liessen sich die Erträge je ha extrapolieren. Zudem wurden je 30 symptomtragende und 30 symptomlose Pflanzen für die Bestimmung von Trockenmasse und Qualitätsparametern entnommen (die Qualitätsbestimmungen erfolgten nach der Methodik Fleck, pers. Mitt. (2003)).

4.2.5 Umfragen, Einsendung von Möhrenproben

Erstmals konnte über den Ökoring Niedersachsen unter Einbindung seines bundesweiten Beraternetzwerkes systematisch Datenmaterial zu symptomtragenden Möhren der Saison 2003 zusammengetragen werden. Kernpunkt der Umfragen bildete eine email an Berater im ganzen Bundesgebiet in der mit der Symptombeschreibung um Angaben zum Vorkommen und der Befallsstärke als % Anteil im Bestand, Sorte, Saattermin, sowie um die Einsendung von symptomtragendem Probenmaterial (ganze Pflanzen mit Laub & Rübenkörpern) gebeten wurde. Das eingeschickte Möhrenmaterial konnte an der BBA Braunschweig anhand der bis dahin erarbeiteten PCR-Markersequenzen auf 7 verschiedenen Virosen untersucht werden, namentlich CtRLV, CMoV/CmoMV, CTLV, CYLV, PYFV, Carlavirus und Benyvirus; siehe Abschnitt 3, S. 27).

Evtl. lückenhaft gebliebenen Angaben im Umfragerücklauf wurde seitens des Ökorings nachgegangen. Die Ergebnisse befinden sich in den Abschnitten 6.1.2 Umfragen (S. 63) und 6.2.1.3 Einsendungen (S. 66).

4.2.6 Bestandes- und Symptomentwicklung

Zu jedem Boniturtermin wurde das EC-Stadium nach Meier (2001) bestimmt.

Mit Auftreten erster roter Blätter (am 4.08.) in den Praxisschlägen wurden im Parzellenversuch Hassel am 7.08. einzelne Pflanzen markiert und zu den weiteren Terminen die Symptomentwicklung bonitiert. Ab dem 4.09. wurden keine weiteren Pflanzen markiert, sondern jeweils die Anzahl weiterer symptomtragender Pflanzen pro Parzelle notiert. Zur Ernte wurden für jede einzelne symptomtragende markierte Pflanze je Parzelle folgende Parameter zusammengestellt: Rotfärbungen (leicht, stark, Stängel), Nekrosen, Kümmerpflanze, Bärtigkeit, Rattenschwänzigkeit, gestauchte Herzblätter und Gewicht.

4.2.7 Qualitätsuntersuchungen

Die Bestimmung der Qualitätsparameter wurde durch das Fachgebiet Ökologischer Land- und Pflanzenbau an der Universität Kassel nach den in Tab. 4 aufgeführten Verfahren durchgeführt. Jede Probe bestand aus Teilproben von jeweils 30 Möhren.

Tab. 4: Durchgeführte Verfahren zur Bestimmung der Qualitätsparameter der Erntemöhren

Parameter	Einheit	Methode
Trockensubstanzgehalt	[%]	gravimetrisch (105°C)
Nitratgehalt	[ppm FM]	CFA-Methode nach DIN EN 12014-7
Zuckergehalt D-Glucose, D-Fructose, Saccharose	[% FM]	enzymatisch nach Testkombinationen der Firma BOEHRINGER
Mineralstoffgehalt P, S, K, Ca, Mg, Si, Na, Cl	[ppm FM resp. % FM]	röntgenfluoreszenzanalytisch (RFA)

5 Ergebnisse Arbeitsgruppe B: Status Quo Analysen, Strategien und Lösungsansätze

5.1 Versuchsverlauf

Bezüglich der klimatischen Rahmenbedingungen war das Versuchsjahr 2003 von extremen Hitze- und Trockenperioden gekennzeichnet. So lag der Temperaturdurchschnitt für die Vegetationsperiode von April-Oktober um 0,5°C deutlich über dem langjährigen Mittel. Extreme Trockenheit von Mitte Juni-Juli trat insbesondere am Standort Hebenshausen auf. Die jew. Klimadaten für den Standort Hassel (Bremen Flughafen) und Hebenshausen (Göttingen) sind im Anhang wiedergegeben (vergl. Anhang 14.2). Konsequenzen hatte dies insbesondere für den atypischen Verlauf des Blattlausfluges in der gesamten versuchsrelevanten Region und einer ausserplanmässigen Nachsaat von Versuchspartellen in Hebenshausen (s.u.). Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden Feldversuche in Hassel und Hebenshausen, sowie des Surveys vorgestellt:

5.1.1 Beschreibung der aufgetretenen Symptome



Abb. 19: Rot- bis Gelbfärbung des Laubes in oberen Blattetagen

Die betroffenen Pflanzen aus dem Haupt-Befallsgebiet Niedersachsen fielen durch das Zusammenspiel mehrerer Merkmale an Laub und Rübenkörper auf:

- Am Laub - **Rot-** bis **Gelbfärbungen** (Abb. 19) im fortgeschrittenen Stadium mit Welke, in Verbindung mit **Kümmerwuchs** der **Herzblätter**, starken Kräuselungen und Stauchungen der Rosette (Abb. 20).
- An der Rübe: **Wurzelbärtigkeit** und sogenannte „**Rattenschwänze**“; letztere sind offenbar das Ergebnis eines fortgeschrittenen Stadiums mit Eintrocknungen (Abb. 21).



Abb. 20: Kümmerwuchs der Herzblätter mit absterbenden älteren Laubblättern



Abb. 21: Verschiedene Ausprägungen von Wurzelbärten und sog. „Rattenschwänzen“

5.1.2 *C. aegopodii* und Virusbesatz an Haupt- und Nebenwirten

Die Inspektionen der Weidenbestände als potentielle Überwinterungsorte in der näheren Umgebung der Möhrenschräge ergaben auch bei wiederholten Kontrollen keinen *C. aegopodii*-Besatz, bis auf einige Funde individuenstarker *Cavariella theobaldi* Kolonien im Mai 2003.

Im Gegensatz zum Vorjahresergebnis Mitte Mai 2002, in dem die Kerbelpflanzen der Weigraine durchgehend hohe *C. aegopodii*-Besätze mit geflügelten und ungeflügelten Stadien an Blüten und Samenständen aufwiesen, waren in 2003 an denselben Beprobungsorten keine Kolonien auffindbar.

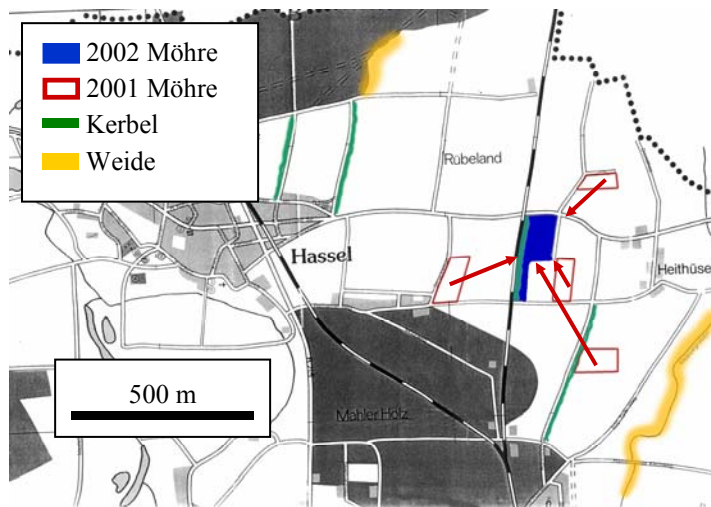


In den Blattprobennahmen an Wildapiaceen mit anschließenden PCR-Testungen erwies sich lediglich eine Probe *Chaerophyllum bulbosum* vom Standort Neuenkirchen als Träger des Parsley yellow fleck virus (PYFV). Alle übrigen *C. aegopodii*-Nebenwirte, die im Vergleich zu benachbarten Pflanzen symptomatisch erschienen (vergl. Abb. 22), lieferten in den PCR-Testungen der BBA kein eindeutiges Resultat (s.o. Pkt. 3 ff.).

Abb. 22: Kerbel mit leichter Rotfärbung der unteren Blattpartien

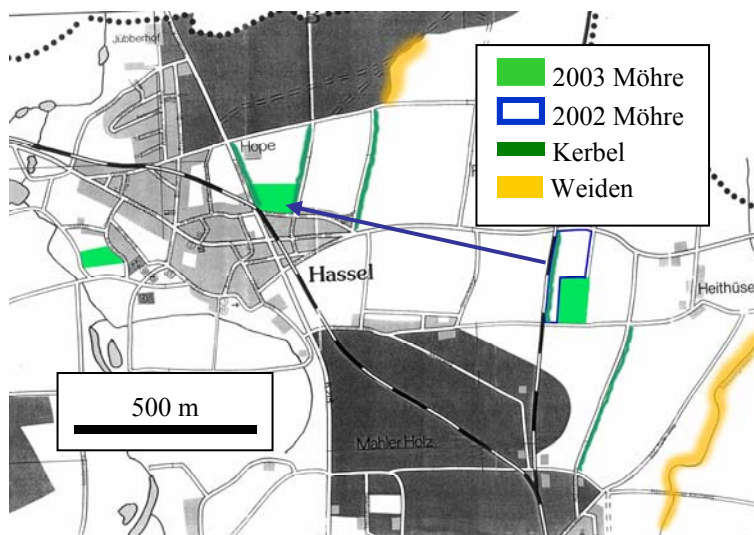
5.1.3 Relative Lage der Schläge und Nebenwirtrefugien

Die Erfassung der relativen Lage der Möhrenschräge auf dem Betrieb Kramer in Hassel in 2002 und 2003 und die Lage zu bedeutenden Kerbel- und Weidenbeständen sollte für den Fall der Bestätigung vektorvermittelter Viruserkrankungen die gezielte Rekonstruktion infektiöser Anbaukonstellationen ermöglichen. Die Schlagdistanzen der Jahre 2001 bis 2003 gehen aus Abb. 22 & 23 hervor.



Im Jahr 2002 lagen drei Flächen, auf denen im Vorjahr 2001 Möhren angebaut wurden, in einem Umkreis von ca. 500m. Weiden als Wirte für die holozyklische Überwinterung von *Cavariella aegopodii* kamen im Umkreis von 1-2 km vor.

Abb. 23: Regionale Möhrenanbaudichte, sowie Haupt- und Nebenwirte von *C. aegopodii* (Hassel 2002)



Im Jahr 2003 lagen die Vorjahresflächen mit ca. 1,5 km relativ weiter voneinander entfernt. Die Lage der Kerbel- und Weidenbestände blieb unverändert (Abb. 24).

Abb. 24: Regionale Möhrenanbaudichte, sowie Haupt- und Nebenwirte von *C. aegopodii* (Hassel 2003)

5.2 Feld und Gewächshausversuche (Universität Kassel)

5.2.1 Feldversuch Hassel 2002 und 2003

5.2.1.1 Blattlausflugverlauf

Das Jahr **2002** war im Untersuchungsgebiet Hassel von einem im Vergleich zu mehrjährigen Beobachtungen (Rieckmann pers. Mitt. 2002) sehr massiven Frühjahrsflug gekennzeichnet. Davon machten *Cavariella*-Arten 90% des Gesamtfangs aus (vergl. Abb. 25). Die Flugaktivität klang ab dem Fangmaximum am 21.05. mit 517 *C. aegopodii* Exemplaren deutlich ab und war bereits in der ersten Juni-Woche abgeschlossen. Die Konzentration des *C. aegopodii*-Fluges auf lediglich ca. 3 Wochen in den Untersuchungsgebieten steht in guter Übereinstimmung mit mehrjährigen Phänologiedaten aus Nachbarregionen (De Box & Piron 1985).

Demgegenüber erfolgte in **2003** ein atypisch sehr spätes Einfliegen der Gesamtarten in die Bestände, dominiert von der Mehligen Kohlblattlaus und einem auf Einzelexemplare begrenzten *C. aegopodii*-Anteil. (Zu beachten sind aus Darstellungsgründen die ungleichen Skalierungen für 2002, 2003!).

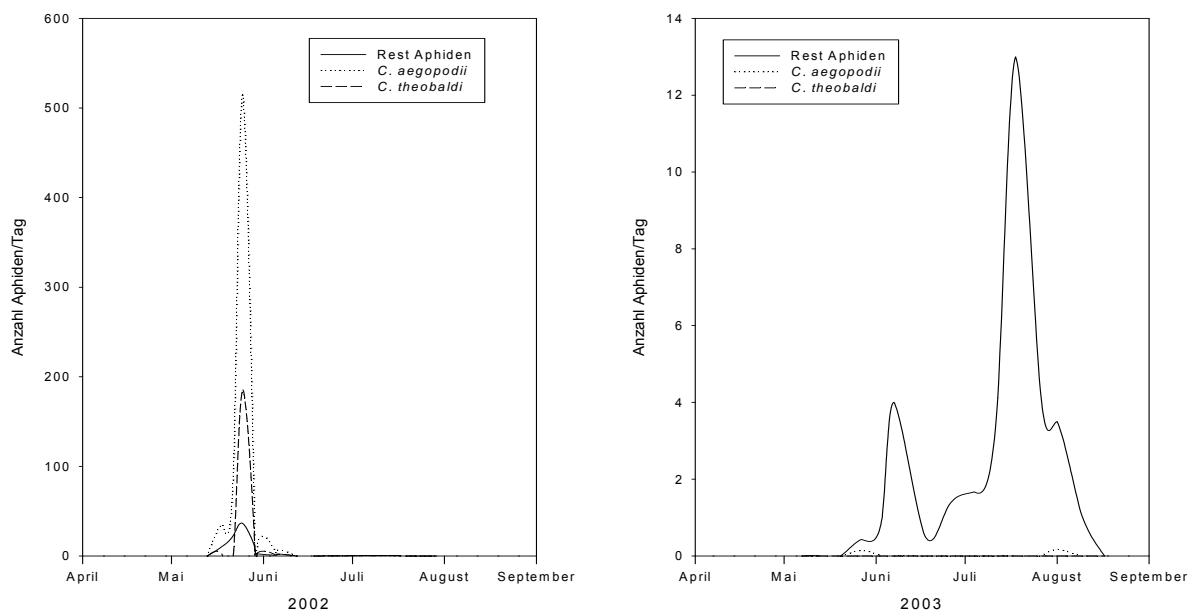


Abb. 25: Gelbschalenfänge der Jahre 2002 und 2003 am Standort Hassel

5.2.1.2 Blattläuse im Bestand

In **2002** wiesen Möhrenkeimlinge bereits vor Einsetzen intensiver Flugaktivität am 15.05. zu 33% *C. aegopodii*-Besatz auf. Infolge weiteren starken Zuflugs und einsetzender Koloniebildung mit > 20 Individuen/Keimling führten starke Wuchsdepressionen durch direkte Saugschäden und Wasserstress zu hohen Keimlingsausfällen und damit lückigem Feldaufgang. Im Möhrenbestand brachen die Blattlausbesätze bis zum 12.06. zusammen und pendelten sich in Folgebonituren bei durchschnittlich unter einer *C. aegopodii*/Pflanze ein. Eine Zuordnung der

Keimlingsausfälle zu reinen Saugschäden, reinem Wasserstress und nematodenbedingten Verlusten oder anderen Ursachen liess sich nicht durchführen.

Im Jahr **2003** konnte eine wesentlich geringere und vor allem wesentlich spätere Blattlausbesiedlung festgestellt werden. Erste *C. aegopodii* auf Möhren konnten in geringen Dichten von 1-3 Läusen auf 10 Pflanzen am 12.06. bonitiert werden. Über die gesamte Vegetationsperiode bewegten sich die Besatzdichten um durchschnittlich zwei *C. aegopodii* pro Pflanze.

5.2.1.3 Einfluss von Netz- und Vliesabdeckungen auf die Symptomentwicklung

Grundsätzlich war in beiden Jahren die im Vertragsanbau gängige Verarbeitungsmöhre Kameran wesentlich stärker durch das Auftreten symptomtragender Pflanzen betroffen, als die Frischmarktsorten Bolero, Nevis und Nebula (Abb. 26). Weiterhin liess sich entsprechend der Erwartung der Trend für beide Jahre festhalten, dass die durchgehend exponierten Kontrollen

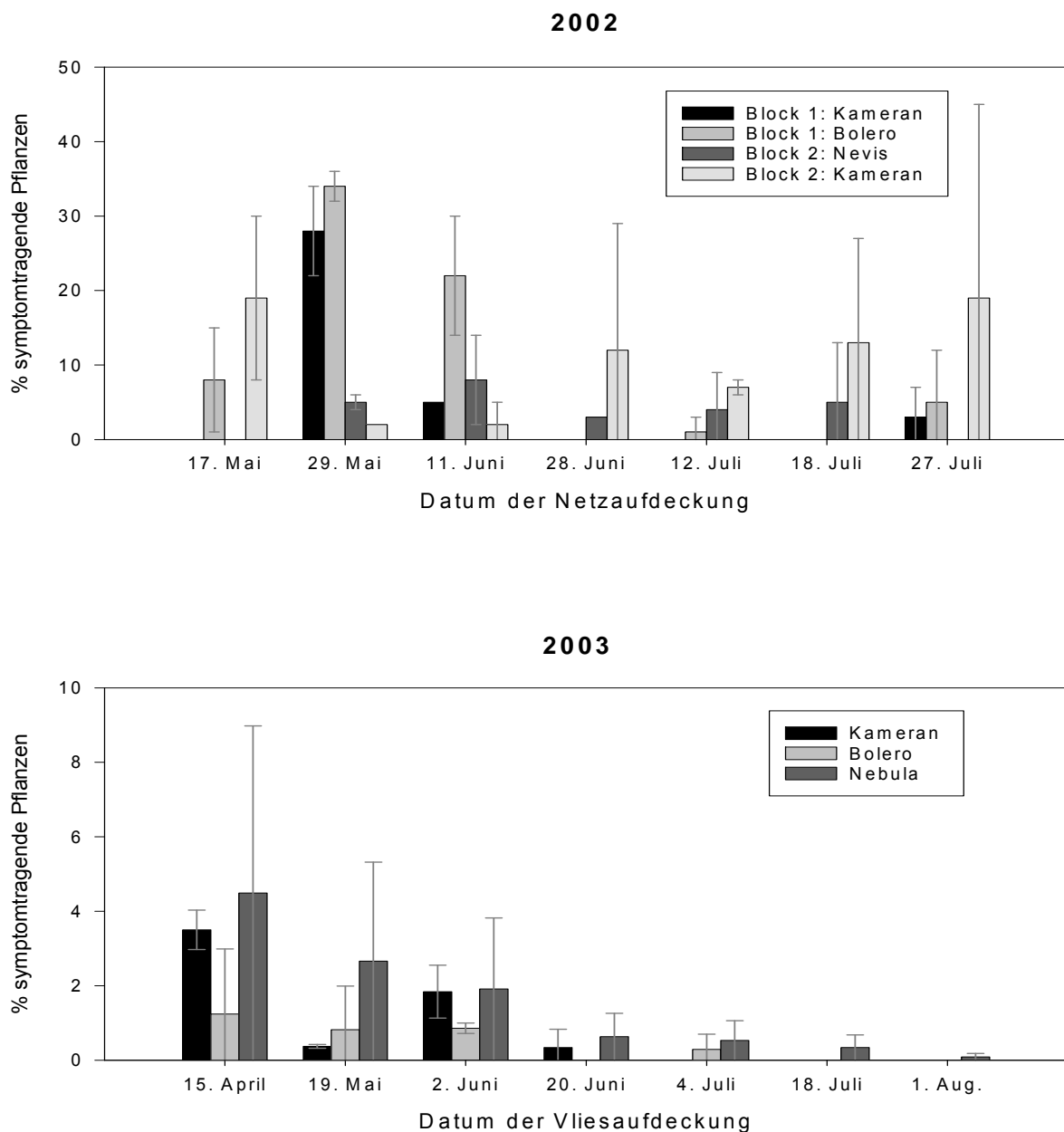


Abb. 26: Anzahl symptomtragender Pflanzen in Abhängigkeit der Vliesaufdeckung am Standort Hassel in den Jahren 2002 (17. Mai entspr. Kontrolle), und 2003 (15. April entspr. Kontrolle).

ohne Netz/Vliesabdeckung und die frühen Aufdeckungstermine meist höhere Anteile symptomtragender Pflanzen aufwiesen als diejenigen Parzellen, die bis Mitte Juni abgedeckt geblieben waren. Die Kontrollparzelle 2002 fällt dabei aus dem Rahmen. Es könnte hier deshalb ein abweichendes Ergebnis vorgelegen haben, da bereits zum Abdeckungstermin geflügelte Blattläuse auf Möhrenkeimlingen festgestellt wurden und das hypothetische Infektionsgeschehen nun mit potentiellen Vektoren unter Netz eventuell effektverstärkend gewirkt haben könnte. Insgesamt fiel die Symptommhäufigkeit im Parzellenversuch Hassel 2003 mit max. 5% wesentlich geringer aus als in 2002 mit bis zu 35%.

5.2.1.4 Symptomausprägung im Vegetationsverlauf

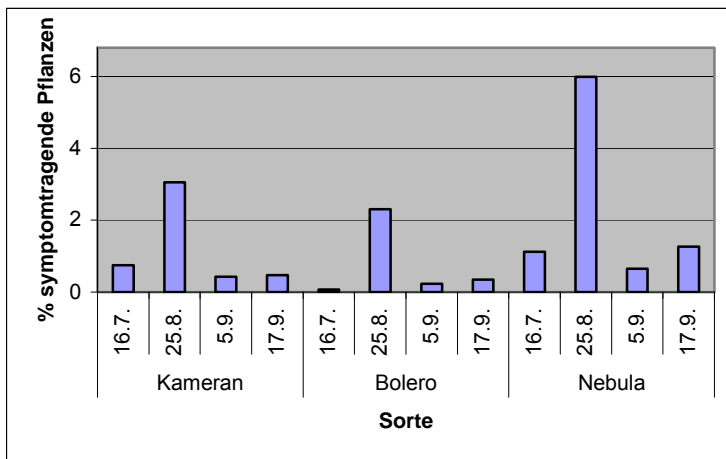


Abb. 27 zeigt das Auftreten symptomtragender Pflanzen der 3 Sorten im Zeitverlauf von Mitte Juli bis Mitte September im nicht mit Vlies abgedeckten Bestand. Es zeigte sich, dass die augenfälligen Blattsymptome von Mitte Juli bis Ende August deutlich zunahmten, dann aber wieder zurückgingen, sich also lediglich über einen Zeitraum von 4 Wochen am Laub manifestierten.

Abb. 27: Anzahl blatt-symptomtragender Pflanzen in den Sorten Kameran, Bolero und Nebula zu unterschiedlichen Terminen am Standort Hassel im Jahr 2003

5.2.1.5 *Alternaria* spp.

In Zusammenhang mit den trockenen Witterungsbedingungen

konnten im Jahr 2003 keine nennenswerten *Alternaria*-Schäden festgestellt werden.

5.2.1.6 Qualitätsparameter

Die Trockensubstanz-, Mineralstoff-, Nitrat- und Zuckergehalte in den Fraktionen symptomtragender und symptomloser Pflanzen sind in Tab. 5 und Tab. 6 wiedergegeben.

Tab. 5: Relativ- und Mittelwerte der Mineralstoffgehalte der Möhrensornten am Standort Hassel 2003.

Sorte		TS	P	S	K	Ca	Mg	Na	Cl
Bolero	SL/ST ^(*)	1,02	1,02	1,02	0,90	1,11	0,93	0,98	0,79
Kamaran	SL/ST	1,12	1,13	1,09	1,02	1,22	1,06	0,83	0,96
Nebula	SL/ST	1,01	0,99	1,00	0,95	1,10	0,95	0,81	0,90
Absolutwert		[%]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]
MW	SL	12,5	338,5	133,6	4001,1	358,7	118,5	171,1	591,3
MW	ST	13,2	353,1	138,0	3818,4	409,1	115,6	148,3	516,4
S	SL	0,65	40,06	13,00	260,83	18,59	16,51	21,63	131,92
S	ST	0,76	19,86	7,53	48,66	4,01	8,40	4,11	67,23

(*) SL/ST: Quotient Absolutwert symptomlos/symptomtragend.

Für die Mineralstoffe schwankten die Relativzahlen als Quotient der jew. Absolutwerte der symptomlosen und symptomtragenden Fraktion um den Wert 1,0 (=keine Veränderung), weshalb innerhalb der methodisch bedingten Schwankungsbreite keine wesentlichen Unterschiede feststellbar waren. Bezüglich der Zuckergehalte lagen die Gehalte gegenüber der symptomlos bonitierten Fraktion überwiegend niedriger.

Tab. 6: Mittelwerte der Nitrat- u. Zuckergehalte der Möhrensorten am Standort Hassel 2003.

Bezeichnung		NO3	Glucose	Fructose	Saccharose	Gesamt-	Mono/
						zucker	Disaccharide
Bolero	SL/ST ^(*)	1,00	0,85	0,87	0,72	0,75	1,18
Kamaran	SL/ST	- (**)	0,72	0,76	1,22	1,11	0,62
Nebula	SL/ST	- (**)	0,79	0,84	0,76	0,77	1,06
		[ppm FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	
MW	SL	4,6	0,7	0,6	4,7	6,1	0,3
MW	ST	< 0,02 (**)	0,6	0,5	4,3	5,4	0,3
S	SL	4,44	0,03	0,02	0,23	0,22	0,02
S	ST	0,00	0,03	0,05	1,31	1,23	0,09

(*) SL/ST: Quotient Absolutwert symptomlos/symptomtragend; (**) Kameran & Bolero unter der Nachweisgrenze.

5.2.2 Feldversuch Hebenshausen

5.2.2.1 Blattlausflugverlauf

Am Standort Hebenshausen unterschieden sich die Gelbschalenfänge 2002 ebenfalls wie in Hassel deutlich vom Jahr 2003. Im Vergleich zum Standort Hassel trat in Hebenshausen im Jahr 2002, zum Zeitpunkt des maximalen Flugaufkommens, die Gierschblattlaus weniger dominant, jedoch mit ca. 40% des Gesamtfanges auf (vergl. Abb. 28).

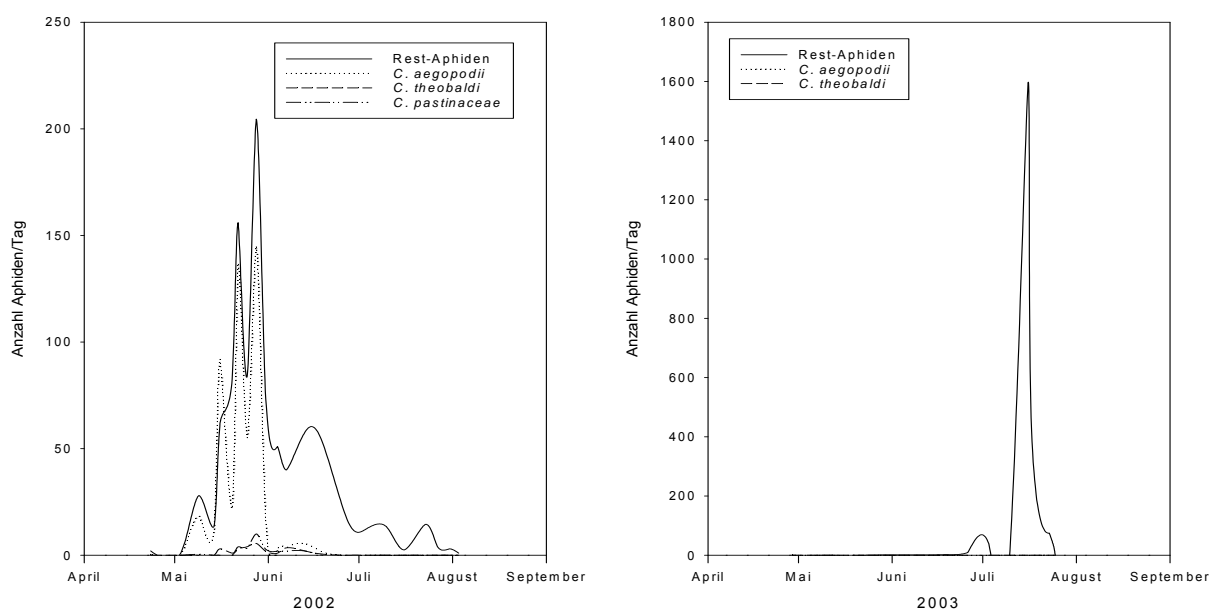


Abb. 28: Gelbschalenfänge in den Jahren 2002 und 2003 am Standort Hebenshausen.

In 2003 bewegten sich die Fangraten in Gebshalen von Mai bis Ende Juni auf vergleichsweise sehr niedrigem Niveau. Bis auf wenige Einzelexemplare von *C. aegopodii* bildeten den Hauptanteil Restaphiden die Mehligke Kohlblattlaus *Brevycoryne brassicae*, die Mitte August, im Zuge der hitzebedingt beschleunigten Abreife von Rapsfeldern „mobilisiert“ (Rieckmann 2003) wurde.

5.2.2.2 Blattläuse im Bestand

Die ersten geflügelten Exemplare von *C. aegopodii* an Möhren traten in 2003 relativ spät, aber in etwa zum gleichen Termin wie in Hassel am 28.05. auf. Stärkere Koloniebildung an Möhren trat nur an der Variante „Kameran früh“ am 10.07. auf, wo durchschnittlich 76 Apteren pro Pflanze gezählt wurden, während bei „Bolero früh“ weniger als 5 Exemplare zu finden waren. Insgesamt blieben auch am Standort Hebenshausen die Besatzdichten bis zum 10. Juli unter zwei *C. aegopodii* pro Pflanze. Zu diesem Termin konnten bei Sorte Kameran durchschnittlich 38 Apteren, bei Bolero 3 Apteren/Pflanze bonitiert werden. In den folgenden 14 Tagen ging der Befall auf nahezu Null zurück.

5.2.2.3 Einfluss von Saatzeitpunkt und Vliesabdeckung auf die Symptomentwicklung

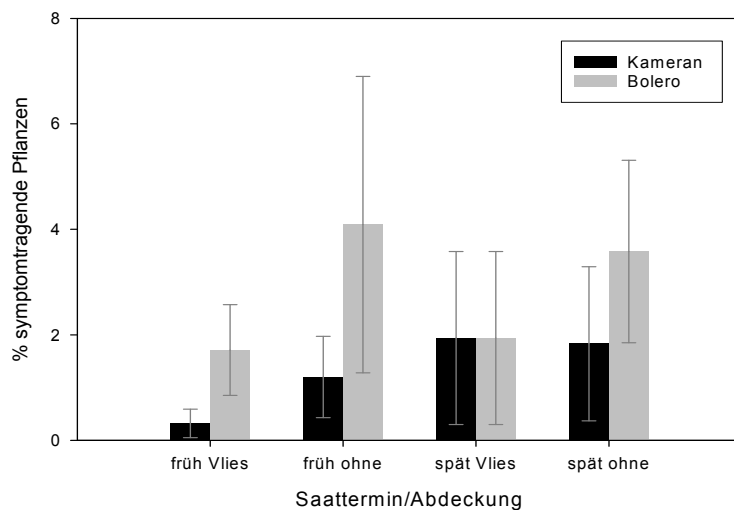


Abb. 30: Anzahl symptomtragender Pflanzen bei früher und später Saat sowie mit und ohne Vliesabdeckung der Sorten Kameran und Bolero am Standort Hebenshausen 2003

Tendenziell wirkten sich sowohl die frühen Saattermine als auch die Vliesabdeckung bei beiden Sorten als symptomreduzierend aus (Abb. 30). Insgesamt bewegte sich die Symptomstärke in der „Nicht-Möhrenanbauregion“ auf einem wesentlich geringeren Niveau als in Niedersachsen. Entgegen der Erwartung war bei der Frischmarktsorte Bolero im Vergleich zur Verarbeitungsorte Kameran ein Trend zu höheren Anteilen symptomtragender Pflanzen zu verzeichnen.

5.2.2.4 Künstliche Inokulation von Jungpflanzen

Das Aufsetzen CtRLV-positiver *C. aegopodii*, auf symptomlose, bis dahin blattlausfreie Jungpflanzen, die noch nach mehreren Tagen auf den Pflanzen zu finden waren, lieferte keine deutlichen Symptome an den Pflanzen

5.2.2.5 *Alternaria spp.*

Im Jahr 2003 waren witterungsbedingt keine nennenswerten Schäden durch *Alternaria* festzustellen.

5.2.2.6 Qualitätsparameter

Bezüglich der Mineralstoffgehalte der Varianten frühe bzw. späte Aussaat streuten die Relativzahlen um den Wert 1,0 = keine Veränderung (Tab. 7).

Tab. 7: Mineralstoffgehalte früher und später Saattermine der Sorten Bolero und Kameran am Standort Hebenshausen 2003.

Bezeichnung		TS	P	S	K	Ca	Mg	Na	Cl
Bolero	relativ ^(*)	0,95	1,03	0,98	0,93	0,93	1,08	0,95	1,25
Kameran	relativ	0,95	0,90	1,04	0,93	0,94	1,04	1,07	0,99
		[%]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]
MW	Früh	14,1	305,9	148,7	4135,3	438,0	112,8	56,4	188,0
MW	Spät	13,4	294,7	150,3	3844,3	409,6	119,8	56,9	208,9
S	Früh	0,93	11,76	5,16	230,29	6,33	18,42	2,97	17,70
S	Spät	0,80	17,10	10,92	196,68	3,22	22,29	1,96	15,91

relativ^(*): Relativzahlen als Quotient frühe Saat/späte Saat.

Bei ähnlichen Gesamtzuckergehalten wies der frühe Saattermin um den Faktor zwei bis drei höhere Anteile an Disacchariden auf (Tab. 8), was mit den schlechten Auflaufbedingungen aufgrund anhaltender Trockenheit für die späte Saat erklärt werden kann.

Tab. 8: Nitrat und Zuckergehalte früher und später Saattermine der Sorten Bolero und Kameran am Standort Hebenshausen 2003

Bezeichnung		NO3	Glucose	Fructose	Saccharose	Gesamtzucker	Mono/Disaccharide
Bolero	relativ ^(*)	1,00	1,90	2,08	0,88	1,06	2,26
Kameran	relativ	1,71	2,63	2,86	0,71	0,91	3,82
		[ppm FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	
MW	früh	101,2	0,5	0,4	6,0	6,9	0,2
MW	spät	181,9	1,1	0,9	4,8	6,8	0,4
S	früh	36,65	0,17	0,15	0,22	0,11	0,06
S	spät	49,81	0,14	0,15	0,55	0,84	0,01

relativ^(*): Relativzahlen als Quotient frühe Saat/späte Saat.

5.2.2.7 Erträge und Sortierungen

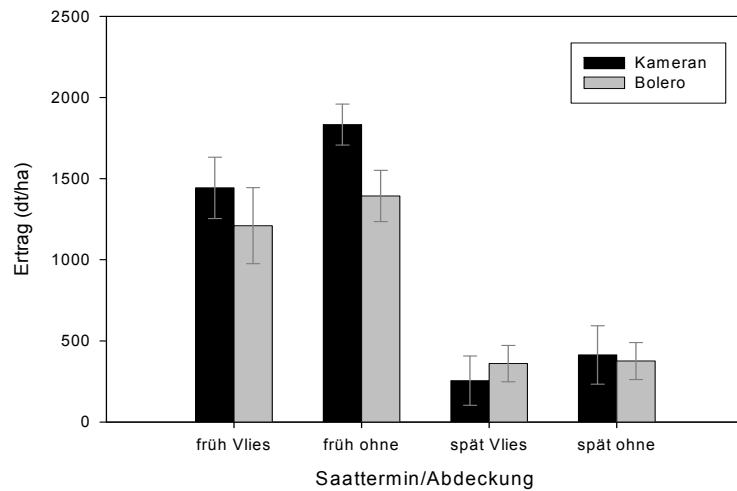


Abb. 31: Erträge unterschiedlicher Saattermine und Vliesabdeckungen am Standort Hebenshausen 2003

Die Variante des frühen Saattermins lieferte für beide Sorten höhere Erträge als die von der Sommertrockenheit beeinträchtigten späten Termine (Abb. 31). Die Vliesabdeckungen bis zum 25.06. hatten bei beiden Sorten des frühen Saattermins eine ertragsreduzierende Wirkung, bei Kameran bis ca. 25%.

6 Survey

6.1.1 Charakterisierung der Hauptproblemregion Niedersachsen

6.1.1.1 Geographische Lage betroffener Betriebe

Die im Survey beprobten Möhrenschnitte lagen in der Hauptanbauregion südlich von Bremen, in einem Transekt von ca. 90km Länge (Abb. 32).

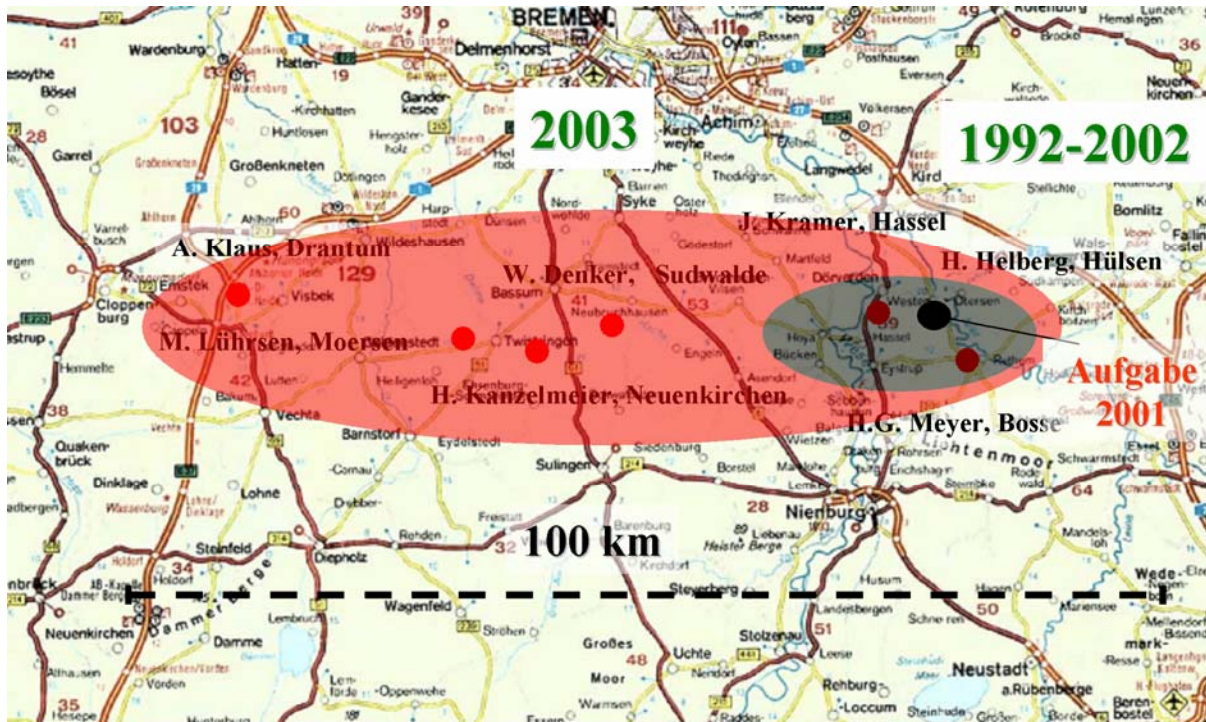


Abb. 32: Lage der im Survey beprobten Praxisflächen in der niedersächsischen Haupt-Problemregion

(● Ökobetriebe, ● konventionell/integrierter Betrieb (August 2003).

6.1.1.2 Möhren-Anbauintensität betroffener Betriebe

Bei den beprobten Betrieben in Niedersachsen schwankte die Anbaufläche an Verarbeitungsmöhren im Jahr 2003 um 5,4 bis 10,7 ha was 5-10% der Ackerfläche entsprach (Tab. 9). In Drantum waren Möhren mit einem Fruchtfolgeanteil von insgesamt 23% vertreten. Drei Betriebe bauten ausschließlich Verarbeitungsware an.

Tab. 9: Möhrenanbauintensität und Spezialisierungsgrad niedersächsischer Betriebe 2003.

Standort	Möhrenanteil in der Furchtfolge	180 Tage-Sorten Ha	120 Tage-Sorten ha	Besonderheiten und Spezialisierungsgrad
	%			
Sudwalde	10,4	5,4	4	Kartoffeln, FM- u. Verarbeitungsmöhren, Getreide, TK-Gemüse (Erbsen), (Körner-) Leguminosen
Neuenkirchen	10	10	0	Kartoffeln, Verarbeitungsmöhren, Getreide, Rote Bete, TK-Gemüse (Erbsen), (Körner-) Leguminosen
Drantum	22,8	10,7	0	Möhren-Anbaupause von 5 Jahren intensiver Gemüsebaubetrieb, sonst haupts. Kohlgemüse, Sellerie, Lauch, (Körner-) Leguminosen
Moersen	5,1	5,0	0	2003 erstmals Möhren, aber vergleichsweise möhrenstarke Region Verarbeitungsmöhren, Rote Bete, Getreide, (Körner-) Leguminosen
Bosse	15	k.A. (*)	k.A.	k.A.
Hassel	6,4	0	5	Kartoffel, Getreide, FM-Möhren, Zwiebeln, (Körner-) Leguminosen
Hülsen	11,7	0	11	seit 2003 keine Verarbeitungsmöhren mehr Haupts. Möhren, Spargel Getreide, (Körner-) Leguminosen

(*) k.A. keine Angabe

6.1.1.3 Symptomentwicklung im Vegetationsverlauf

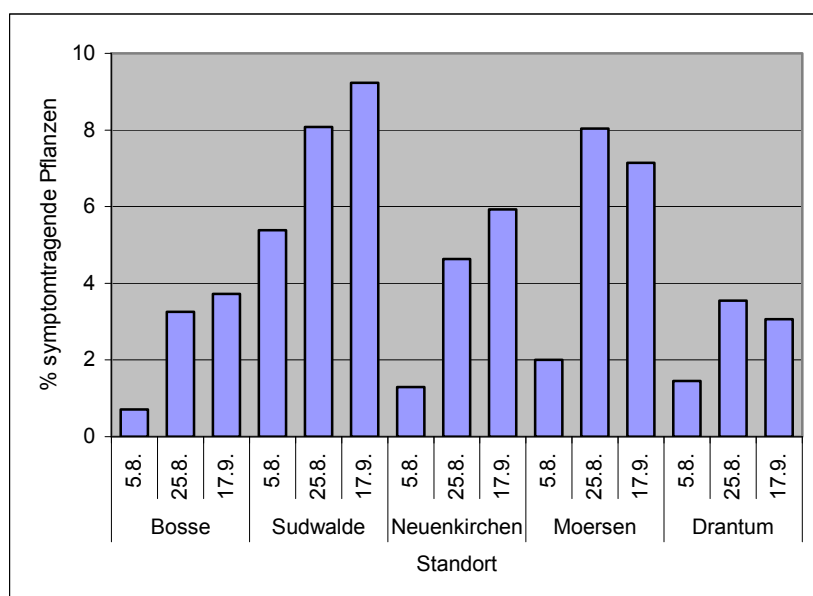


Abb. 33: Symptomentwicklung (Blattsymptome) auf niedersächsischen Praxisbetrieben 2003.

In Abb. 33 sind die Boniturergebnisse auf Blattsymptome der niedersächsischen Praxisflächen im Zeitverlauf vom 5. August bis zum 17. September aufgezeigt. Bis Ende August war eine kontinuierliche Zunahme der Symptommhäufigkeit zu verzeichnen. In Moersen und Drantum war die Tendenz zum 17.09. wieder leicht rückläufig, was auf die Überwachung welkend-absterbender Blätter von symptomlosem Laub zurückzuführen war.

6.1.1.4 Ernteverluste auf Praxisbetrieben



Abb. 34: Probenahme auf dem Praxisschlag Neuenkirchen.

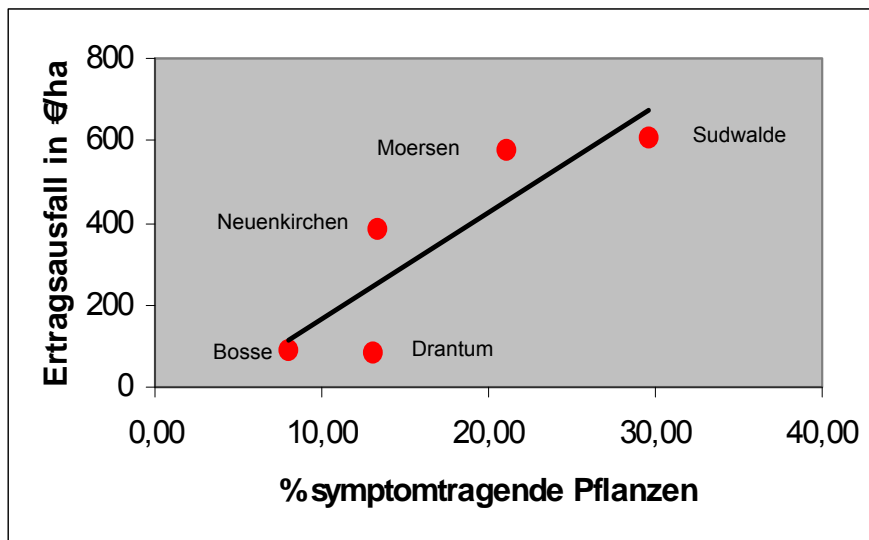


Abb. 35: Kalkulatorischer Ertragsausfall in Beziehung zum Anteil symptomtragender Pflanzen im Bestand

tige Rübenkörper mit weniger Gewichtsreduktion vor. Die durchschnittliche Gewichtsreduktion symptomtragender Pflanzen der fünf Standorte lag gegenüber der symptomlosen Vergleichsgruppe bei 31%. Multipliziert mit dem Anteil symptomtragender Pflanzen umfassten damit die kalkulatorischen Rohertragseinbußen im Gesamtbestand der fünf Flächen eine Spanne von 1,4 bis 10,1%. Bei einer angenommenen Ertragserwartung von 500 dt/ha und einem sehr moderat angesetzten Erlös von 0,12 €/kg betragen diese bis zu 600 €/ha (Sudwalde, Abb. 35).

6.1.1.5 Qualitätsparameter

Im Vergleich der Mineralstoff-, Nitrat- und Zuckergehalte von symptomtragenden und symptomlosen Pflanzen der Praxisschläge waren keine bedeutenden Unterschiede feststellbar.

In Neuenkirchen wiesen max. 6% Pflanzen Blatt-symptome auf (vergl. Abb. 34), in der Erntebonitur waren unter Berücksichtigung der Rübenkörper insgesamt 13% symptomtragend. Letztere Abbildung illustriert auch die wichtige Beobachtung, dass wie auch auf den anderen beprobten Flächen, symptomtragende Pflanzen sehr gleichmäßig über den gesamten Bestand verteilt waren. Ewaige Symptomgradienten, Randeffekte oder Herdbildungen waren nicht erkennbar. Maximale Anteile in der Erntebonitur mit 30% symptomtragenden Pflanzen wurden am Standort Sudwalde festgestellt. Die Ertragsgewichtsreduktion war dabei eng an das Symptombild „Ratenschwänzigkeit“ gebunden. Je nach Fläche herrschten teils stark eingetrocknete ratenschwänzige, andernorts verstärkt wurzelbärtige Rübenkörper mit weniger Gewichtsreduktion vor. Die durchschnittliche Gewichtsreduktion symptomtragender Pflanzen der fünf Standorte lag gegenüber der symptomlosen Vergleichsgruppe bei 31%. Multipliziert mit dem Anteil symptomtragender Pflanzen umfassten damit die kalkulatorischen Rohertragseinbußen im Gesamtbestand der fünf Flächen eine Spanne von 1,4 bis 10,1%. Bei einer angenommenen Ertragserwartung von 500 dt/ha und einem sehr moderat angesetzten Erlös von 0,12 €/kg betragen diese bis zu 600 €/ha (Sudwalde, Abb. 35).

Mineralgehalte und Trockenmasse waren in der symptomtragenden Fraktion offenbar infolge Eintrocknung leicht erhöht. (Tab. 10). Die Nitratwerte waren bei den symptomtragenden Rüben eher geringer und bewegten sich mit max 155 ppm deutlich unter dem Grenzwert für Babyernährung von 250 ppm). Allgemein lagen die Trockenmassegehalte und Gesamtzuckergehalte (6-7%) auf einem für Möhren hohem Niveau (Fleck pers. Mitt. 2003). Das gilt auch für die anderen Versuchsstandorte (Tab. 5 und Tab. 6, S.55; Tab. 7 und Tab. 8; 58).

Tab. 10: Mineralstoffgehalte symptomtragender und symptomloser Möhren von 5 Standorten in Niedersachsen.

Bezeichnung		TS	P	S	K	Ca	Mg	Na	Cl
Bosse	SL/ST ^(*)	1,09	1,06	1,06	1,10	1,13	1,03	1,19	0,69
Sudwalde	SL/ST	1,05	1,11	0,96	1,07	1,17	0,93	0,74	1,11
Neuenkirchen	SL/ST	1,09	1,03	1,03	1,09	1,14	0,93	0,88	0,54
Moersen	SL/ST	1,07	1,20	1,08	1,14	1,25	1,11	1,14	0,67
Drantum	SL/ST	1,08	1,05	0,93	1,06	1,06	1,05	0,93	0,70
		[%]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]	[ppm FM]
MW	SL	13,2	294,7	168,3	3773,9	378,1	116,0	183,6	314,1
MW	ST	14,2	320,8	169,5	4107,9	433,8	116,8	179,6	219,2
S	SL	1,10	36,38	17,03	412,14	28,81	12,72	30,46	156,23
S	ST	1,23	42,01	11,33	391,33	17,10	11,20	50,25	82,17

(* SL/ST: Quotient Absolutwert symptomlos/symptomtragend.)

Tab. 11: Nitrat und Zuckergehalte symptomtragender und symptomloser Möhren im Vergleich von 5 Standorten in Niedersachsen.

Bezeichnung		NO3	Glucose	Fructose	Saccharose	Gesamt-Zucker	Mono/Disaccharide
Bosse	SL/ST ^(*)	0,40	1,03	1,02	1,18	1,15	0,87
Sudwalde	SL/ST	0,42	1,00	1,03	1,06	1,05	0,96
Neuenkirchen	SL/ST	0,50	1,37	0,92	1,03	1,06	1,12
Moersen	SL/ST	0,75	0,87	0,84	1,20	1,06	0,71
Drantum	SL/ST	2,29	1,21	1,31	0,98	1,05	1,29
		[ppm FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	[% FM]	
MW	SL	77,0	0,9	0,8	4,4	6,1	0,4
MW	ST	38,1	1,0	0,8	4,8	6,5	0,4
S	SL	74,99	0,33	0,31	0,75	0,90	0,17
S	ST	28,61	0,22	0,23	0,73	0,88	0,10

(* SL/ST: Quotient Absolutwert symptomlos/symptomtragend.)

6.1.2 Bundesweite Umfrage zu betroffenen Anbauregionen

Das beschriebene Symptombild wurde in den Umfragerückläufen des Ökorings Niedersachsen für die Bundesländer Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Hessen, Thüringen und Bayern bestätigt (Tab. 12). Der Grossteil der für die Virusanalysen einge-

schickten Pflanzen stammte dabei aus Frischmarktbeständen (120-Tage Sorten) mit einem durchschnittlichen Anteil symptomatischer Pflanzen von ca. 5%.

In **Niedersachsen** war die Symptomatik bereits seit 1992 bekannt, zwar im unterschiedlichen Ausmaß, aber regelmässig und offenbar mit steigender Tendenz.

In einem zusätzlich vom Ökoring organisierten Survey im niedersächsischen Möhrenanbaugbiet (90-km Ost-West-Transekt von Walsrode bis Cloppenburg) waren in 2003 erstmals auch Landwirte betroffen, deren Bestände bisher keine solchen Symptome in Möhren aufwiesen (Abb. 32). In 2003 wurden bereits am 16. Juli in konventionellen Beständen in Bosse erste symptomtragende Pflanzen gefunden. Zwei Wochen später wiesen auch viele andere Möhrenflächen der Region verstärkt Symptome auf, während in den Vorjahren die Symptomatik oft nicht vor Ende August, Anfang September augenfällig wurde (Rau, pers. Mitt. 2003).

In Anbauregionen **Nordrhein-Westfalens** mit ebenfalls hohen Möhrenanteilen wurden in der Beraterumfrage durchschnittlich Anteile von 3-5% genannt. Auch in **Bayern** aus dem Großraum München (Hipp-Vertragsanbau) wurden größere Ausfälle seit 2001 gemeldet.

Zu den weniger betroffenen Bundesländern mit geringem bis sporadischem Auftreten gehörten **Nordhessen**, Hessische Staatsdomäne Frankenhäusen, mit \pm gleichbleibenden Anteilen um 1 -3 % in den letzten drei Jahren. In Selektionsbeständen für die Saatgutgewinnung der Bingenheimer Saatgut AG und Dreschflegel GbR wurden symptomtragende Pflanzen in Anteilen von 3% (Nordhessen) in **Thüringen** bis ca. 6% festgestellt. Für **Schleswig-Holstein** wurde seit 2001 das gelegentliche Auftreten symptomtragender Pflanzen bis ca. 3% gemeldet. Die geographische Lage der Betriebe mit Testergebnis illustriert Abb. 36, S. 64.

Tab. 12: Einsendungen symptomtragender Möhren, bundesweite Umfrage 2003

Nr.	Einsender/Betrieb	Bundesland	symptomatische Pflanzen	Sorte	Reifetyp (Tage)	Befund
1	Klaus Kühling Gemüseberatungsring Dithmarschen 25709 Marne	Schleswig-Holstein	1-2 %	Nerac	120	nicht geklärt
2	LWK Schleswig-Holstein Versuchsfeld Speicherkoog 24103 Kiel	Schleswig-Holstein	5%	Nerac	120	CtRLV
3	5 Betriebe südlich von Bremen (siehe Tab. 9, S. 61)	Niedersachsen	17%	hauptsächlich Kameran	180	CtRLV Benyvirus ähnlich
4	Klaus Rauhaus Gut Wendlinghausen 32694 Dörentrup	Nordrhein-Westfalen	3 %	Kamaran	180	CMoMV

5	Thomas Holz Betrieb Seyfried/Zadelhoff 33619 Bielefeld	Nordrhein- Westfalen	3-4 %	Major	120/180	nicht geklärt
6	Hr. Nemesch Gärtnerei Uhlenburg 32584 Löhne	Nordrhein- Westfalen	5%	Valor	120	Benyvirus ähnlich CtRLV
7	Thomas Holz Hof Simon 49497 Mettingen	Nordrhein- Westfalen	2-3%	Bolero	120	Benyvirus ähnlich
8	Hr. Holz Hof Steinhorst 59320 Ennigerloh	Nordrhein- Westfalen	3-4%	Bolero	120	nicht geklärt
9	Pflanzenschutz- dienst Hessen, R. Ulrich Antoniusheim 360 Fulda	Hessen	n.b. (*)	n.b.	n.b.	Benyvirus ähnlich
10	Dreschflegel Quirin Wember 37217 Ellingerode	Hessen	sehr unter- schiedlich	verschie- dene	Vermeh- rung	nicht geklärt
11	Dreschflegel Martina Bünger 37318 Schönhagen	Thüringen	6%	verschie- dene	Vermeh- rung	CtRLV
12	Bayern Postunfall, Nachforschun- gen erfolglos	Bayern	n.b.	n.b.	n.b.	nicht geklärt

(* n.b. nicht bekannt)

6.2 Ergebnisse der Virusanalytik

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf PCR-Analysen, die an der BBA Braunschweig durchgeführt wurden. Sämtliche Proben wurden auf die im Projekt selbst erarbeiteten und die von andernorts bereitgestellten Markersequenzen (Primer) für Möhrenviren (3, S. 27) getestet, namentlich:

1. CtRLV
2. CMoV / CMoMV
3. CTLV
4. CYLV
5. PYFV
6. *Carlavirus* ähnlich
7. *Benyvirus* ähnlich.

6.2.1 Symptomatik und Infektionsstatus in der Hauptproblemregion Niedersachsen

6.2.1.1 Virusbefunde im Survey Niedersachsen

Die PCR-Testungen der Erntestichproben Mitte August auf CtRLV (jew. 10 symptomtragende und 10 symptomlose Pflanzen von 6 Praxisschlägen) ergaben an allen 6 beprobten Standorten ein gleichmässig verteiltes Infektionsniveau für CtRLV von 40-60%. Dieses war unabhängig von der Einstufung symptomtragend oder symptomlos (Tab. 13). Das zur Komplettierung der vermuteten CMD-Mischinfektion gesuchte CMoV oder CMoMV, liess sich in keiner der Proben mit den zur Verfügung stehenden Primern nachweisen.

Tab. 13: PCR-Befunde für CtRLV und CMoV/CMoMV in Möhrenproben der 5 Betriebe in Niedersachsen 2003

Betrieb	Einstufung	CtRLV [%]	CMoV/CMoMV [%]
Bosse	SL / ST	50 / 40	0 / 0
Sudwalde	SL / ST	40 / 60	0 / 0
Neuenkirchen	SL / ST	50 / 50	0 / 0
Moersen	SL / ST	60 / 40	0 / 0
Drantum	SL / ST	40 / 60	0 / 0
Versuch Hassel	SL / ST	60 / 40	0 / 0

(* SL/ST: symptomlos / symptomtragend)

Auch für den Befund des sog. Benyvirus auf dem Betrieb in Sudwalde mit überdurchschnittlich hohen Anteilen wurzelbärtiger Rübenkörper galt, dass 40% viruspositive Einzelpflanzen offenbar latent infiziert waren, lediglich 20 % der symptomtragenden Pflanzen waren positiv.

Da die Ausprägung der Symptommerkmale evtl. das Ergebnis eines Zusammenspiels der beiden am häufigsten vorgefundenen Virose, CtRLV und sog. Benyvirus, war, wurden für das Pflanzenmaterial sämtliche Symptommerkmale von Blatt und Rübe für die symptomlose und

symptomtragende Fraktion daraufhin aufgeschlüsselt (Tab. 14). Bis auf die Gewichtsreduktion ST / SL um ca. 42 % war für das PCR-Ergebnis keine eindeutige Zuordnung zu den aufgelisteten Blatt- und Rübenmerkmalen herstellbar. Zwar war die Merkmalsgruppe leichte Rotfärbungen der jungen, mittleren und älteren Blätter häufiger CtRLV- und sog. Benyvirus-positiv, jedoch wiesen die Zuordnungen starker Rotfärbungen und die gesamten Wuchsanamalien des Rübenkörpers kaum zu interpretierende Inkonsistenzen auf. Dies traf ebenso für nachgewiesene Einzelinfektionen (allein CtRLV, bzw. Benyvirus-ähnlich) als auch deren Mischinfektionen zu.

Tab. 14: Symptomatik und Infektionsstatus von Möhren der Praxisbetriebe in Niedersachsen 2003

Befund	Anzahl	G	Blattsymptome												Rübensymptome				
			Rot leicht %			Rot stark %			Rot Stängel %			Nekrosen %			%	%	%	%	
			jung	Mittel	alt	jung	mittel	alt	jung	Mittel	Alt	Jung	mittel	Alt	Kümmervuchs	Bärtigkeit	Rattenschwanzigkeit	gestauchte Herzblätter	
SL	50	220	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	12	0	2	0	0
ST	50	127	48	38	6	2	38	6	2	4	8	4	4	54	0	54	56	52	
Summe	100																		
PCR-negativ	47	164	17	11	2	2	26	6	0	0	2	2	2	32	0	26	28	32	
CtRLV	50	178	32	28	4	0	14	4	2	4	6	2	2	36	0	30	28	22	
Benyvirus	3	249	33	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	33	0	

6.2.1.2 Virusbefunde in Hassel und Hebenshausen

Der Vergleich der Boniturparameter des Einzelpflanzenmonitorings mit den Virus-Testergebnissen der PCR ergab auch für die Versuche in Hassel und Hebenshausen kein deutlich abgrenzbares Bild für die Fraktion symptomtragend und symptomlos (Tab. 15). In den meisten Fällen wurde das Beny-ähnliche Virus nachgewiesen (Hassel 20%, Hebenshausen 40%), zusätzlich CYLV und in zwei Fällen das CtRLV.

Tab. 15: Symptomatik und Infektionsstatus de Versuchsstandorte Hassel und Hebeshausen 2003.

Befund	Anzahl	σ Gew. mit Kraut	Blattsymptome											Rübensymptome				
			Rot leicht %			Rot stark %			Rot Stängel %			Nekrosen %		%	%	%	%	
			jung	Mittel	Alt	jung	mittel	alt	jung	mittel	Alt	jung	mittel	Alt	Kümmerswuchs	Bärtigkeit	Rattenschwanzigkeit	gestauchte Herzblätter
Hassel																		
negativ	29	59 ^(*)	3	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	17	3	3	3	3
Benyvirus	7	49 ^(*)	14	43	0	0	14	14	0	0	0	0	0	71	0	29	0	14
Hebeshausen																		
negativ	23	167	22	9	0	4	17	9	0	0	0	13	52	52	0	43	35	48
CtRLV	2	502	50	50	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	0	100	50	50
Benyvirus	17	156	12	41	0	0	12	12	0	0	6	6	24	53	0	35	24	35
CYLV	1	270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0

^(*) Trockenschäden

Neben den Bonituren zur Ernte wurde in Hebeshausen die Symptomentwicklung im Vegetationsverlauf an markierten Pflanzen erfasst. Die Ergebnisse lieferten allerdings keine Hinweise auf eine typische Sequenz der Symptomatik in den verschiedenen Entwicklungsstadien (vergl. Anhang 14.3, S. 91).

6.2.1.3 Virusbefunde von Einsendungen aus dem Bundesgebiet

In allen fünf Bundesländern konnte das Carrot red leaf virus (CtRLV) nachgewiesen werden (Abb. 36), welches in Niedersachsen zudem an allen Standorten in hohen Anteilen präsent war. Weiterhin wurden CMoMV (Pkt. 3.2), CYLV (Pkt 3.4) und das bisher nicht näher charakterisierte Beny-ähnliche Virus (vergl. 3.6) identifiziert.

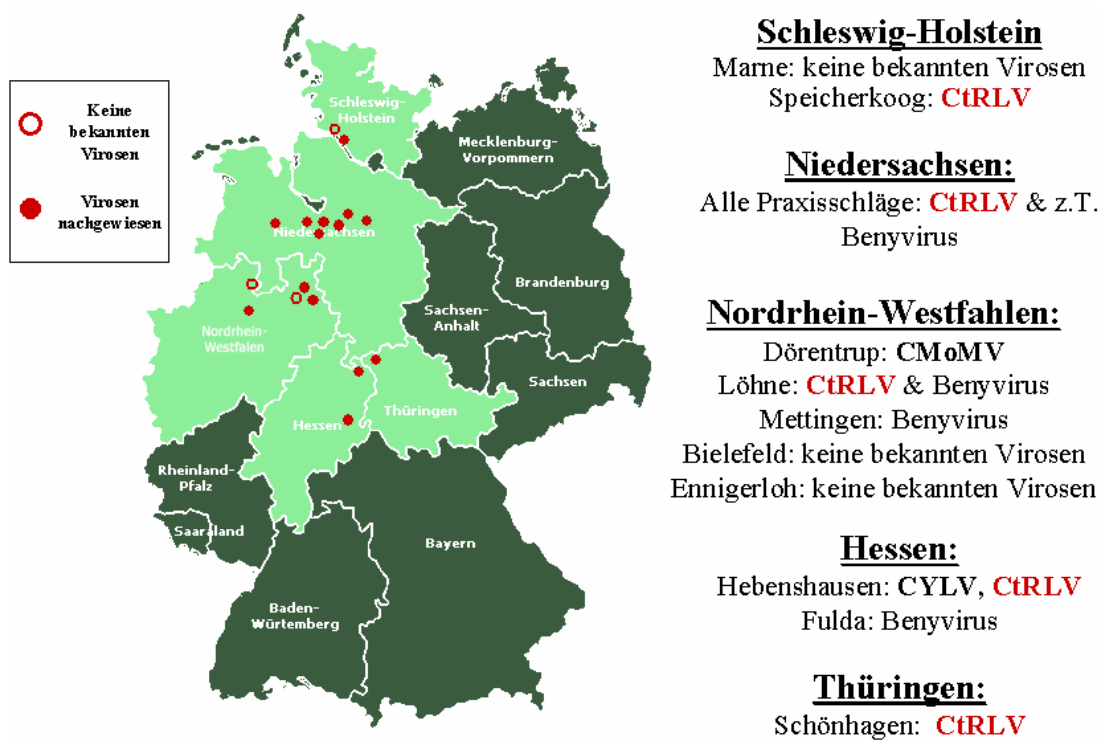


Abb. 36: Herkunftsregionen und Virusbefunde in den eingesendeten Möhrenproben 2003

7 Diskussion der Ergebnisse

7.1 Entwicklung eines Virusnachweises

Im Vergleich zu Virose an anderen Gemüsekulturen gelten die an Möhren vorkommenden Viruskrankheiten als unzureichend charakterisiert. Aus dem gleichen Grunde sind nicht nur die durch bestimmte Möhreviren verursachten Schadbilder und Ertragsausfälle weitgehend unbekannt, sondern es liegen für Möhreviren auch fast keine Antiseren und kaum Sequenzinformationen vor. Angesichts dieser Ausgangssituation konzentrierten sich die virologischen Untersuchungen einerseits darauf, möglichst viele Viren (oder wenigstens bestimmte Genomteile) aus symptomatischen und symptomlosen Möhren zu isolieren und zu deren Nachweis eine spezifische PCR-Methode zu entwickeln. Unser besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf Isolate des CtRLV als der wichtigsten Komponente (Helfervirus) des CMD-Komplexes. Hier galt es nicht nur eine PCR-Methode zum CtRLV-Nachweis zu entwickeln, sondern auch bestimmte CtRLV-Isolate für die Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Die molekulare Charakterisierung der CtRLV-Isolate offenbarte überraschende Sequenzunterschiede in deren Hüllprotein-Gen. Diese auffällige Diversität spricht für das Vorkommen von wenigstens 2-3 verschiedenen Pölerovirus-Arten im deutschen Möhrenanbau, die sich auch von dem kalifornischen CtRLV-Isolat klar unterscheiden. Letzteres erklärt auch, warum deutsche Isolate nicht mit einem Antiserum gegen ein kalifornisches CtRLV nachgewiesen werden können.

Nicht nur wegen der CtRLV-Diversität, sondern auch wegen des zeitlichen Aufwands, der mit der Etablierung und Vermehrung von verschiedenen (reinen) CtRLV-Isolaten in geeigneten Testpflanzen verbunden ist, wurde zunächst versucht, Antiseren gegen bakteriell exprimierte Hüllproteine der Isolate Hassel, Aschersleben und Kalifornien herzustellen. Aus noch unbekanntem Gründen scheiterten diese Versuche, während wir mit dem gleichen methodischen Ansatz für das Closterovirus CYLV sehr brauchbare Antikörper herstellen konnten. Deswegen wurden gegen und nach Projektende auch noch der konventionelle Ansatz (Virusvermehrung in Möhren und Reinigung der Virionen aus großen Mengen an Blattmaterial) zur Herstellung von Antikörpern gegen CtRLV-Isolate erprobt. Da sich die Virionenreinigung bisher als schwierig erwiesen hat, liegen noch keine brauchbaren CtRLV-Antiseren vor. Im Gegensatz dazu lieferte der konventionelle Ansatz ein ELISA-taugliches Antiserum gegen das Potyvirus CTLV. Versuche zur Herstellung eines Antiserums gegen den *Anthriscus*-Stamm des Sequivirus PYFV sind nach Projektende ebenfalls erfolgreich angelaufen.

Abgesehen von CtRLV, CMoV/CMoMV, CYLV, CTLV and PYFV, wurden auch noch Hinweise für das Vorkommen eines Carlavirus, eines Vitivirus und eines Virus von noch unbekannter Zuordnung („Beny“-Virus) erhalten. Das „Beny“-Virus und das CtRLV wurden am häufigsten nachgewiesen und scheinen damit am weitesten verbreitet zu sein. Zum RT-PCR-Nachweis all dieser Viren wurden Primer entwickelt, die sich Rahmen der Routineuntersuchungen des Projektes bewährten. Da das Ausmaß der Variabilität der meisten der hier untersuchten Viren wegen der begrenzten Projektlaufzeit (12 Monate) noch nicht ausreichend beurteilt werden kann, bedarf die universelle Brauchbarkeit der hier entwickelten RT-PCR-Primer der Überprüfung. Deswegen sind weitere Untersuchungen erforderlich. Dies gilt insbesondere für den Nachweis und die Charakterisierung (z.B., Vektorspezifitäten, Wirtskreisunterschiede) der hier beschriebenen CtRLV-Varianten. Ähnliches gilt für das „Beny“-Virus, das nicht nur weit verbreitet zu sein scheint, sondern offensichtlich auch starke Schädigungen (ausgeprägter Kleinwüchsigkeit) verursachen kann.

7.2 Symptomatik

Die im Projektrahmen erarbeiteten Analyse-Ergebnisse zu vorliegenden Virusinfektionen deuten auf einen offenbar vielschichtigeren Ursachenkomplex hin, als ursprünglich angenommen. Der hohe Anteil latenter CtRLV-Infektionen und das gleichzeitig kaum nachweisbare Umbra-virus CMoV lassen vermuten, dass in den Hauptproblemgebieten keine CMD-Mischinfektion vorliegt, wie es Angaben phytopathologischer Standardwerke nahe legen. Der mit dem Projektkonzept angestrebte Abgleich von Symptomatik und Diagnose massgeblich beteiligter(n) Ursache(n) liess sich deshalb aus den unter 7.1. genannten Gründen bisher nicht erbringen.

7.3 Ernteverluste auf Praxisbetrieben und Qualitätsparameter

Die wirtschaftliche Bedeutung der Symptomatik im niedersächsischen Anbaugebiet war in erster Linie dem Anteil „rattenschwänziger“ Rübenkörper, als reiner Gewichtsverlust infolge von Eintrocknungs- und Welkeerscheinungen zuzuschreiben. Die wertgebenden Inhaltsstoffe, Minerale und jew. Zuckergehalte, waren in den symptomtragenden Fraktionen weniger stark betroffen als zunächst angenommen. Allgemein lagen die Trockenmassegehalte und Gesamtzuckergehalte (6-7%) auf sehr hohem Niveau, welches in der anhaltenden Sommertrockenheit begründet sein dürfte. Geringere Nitratwerte in rattenschwänzigen Rüben könnten als Zeichen einer stagnierenden Entwicklung infolge plötzlich einsetzender Welke gedeutet werden. Das Symptombild Wurzelbärtigkeit kann möglicherweise als Reaktion der Rübe auf Engpässe bei der Wasserversorgung (absterbende Hauptwurzel) sein, was erst im Endstadium zur „Rattenschwänzigkeit“ führt. Die Eingrenzung, in welcher Entwicklungsphase es zur Abwelke betroffener Pflanzen kam, sollte mit dem Parzellenversuch in Hebenshausen geklärt werden. Infolge der witterungsbedingten Bestandeslücken und Mindererträge und des dort unterrepräsentierten Anteils rattenschwänziger Möhren muss die Interpretation vorliegender Daten jedoch zunächst zurückgestellt werden.

Die grundsätzliche Möglichkeit ertragswirksamer Ausfälle als Jungpflanzenverlust, z.B. infolge PYPV-Infektion (verl.3.5) konnte zunächst für die niedersächsischen Praxisflächen des erst ab August angelaufenen Surveys nicht ausgeschlossen werden. Dies erschien für das Jahr 2003 jedoch wenig wahrscheinlich, da in 2003 weder in den Zählstrecken am Standort Hassel erhöhte Keimlings- bzw. Jungpflanzensterblichkeit festgestellt wurden, noch auf den beprobten Praxisschlägen Bestandeslücken auffällig waren. Desweiteren hätten in den Vliesabdeckungsvarianten deutliche Unterschiede als Anzahl Pflanzen / Meter Zählstrecke sichtbar werden müssen. Gegenwärtig ist davon auszugehen, dass sofern virusbedingt lethal verlaufende Frühinfektionen auftraten, diese in der Ertragsentwicklung von Bestandesnachbarn kompensiert wurden.

7.3.1 Anfälligkeit von Verarbeitungs- und Frischmarktsorten

Die Ergebnisse zum Vergleich der Verarbeitungs- und Frischmarktmöhren deckten sich weitgehend mit der Erwartung geringerer Symptomausprägungen bei Frischmarktsorten. Allerdings bildeten den Grossteil der Einsendungen des Survey symptomatische Frischmarkt-Bundmöhren und auch im Versuch Hassel erreichte die Frischmarktsorte Nebula Symptommhäufigkeiten, die der Verarbeitungssorte Kameran vergleichbar waren (vergl. 5.2.1.3, S. 54).

7.4 Status von *C. aegopodii* als potentieller Vektor

Die Daten zum Dominanzspektrum vorkommender Blattlausarten im niedersächsischen Anbaubereich aus 2001/02 weisen den vermuteten Hauptvektor *C. aegopodii* als eine sehr prävalente Art dieser Region aus. Trotz des atypischen Fangverlaufs mit Gelbschalen in 2003, mit nur wenigen Individuen/Gelbschale, bleibt festzuhalten, dass *C. aegopodii* die Möhrenbestände zwar im Vergleich zu Vorjahren verzögert, in nur geringerer Dichte, aber dennoch flächendeckend in Individuenzahlen besiedelte, die als infektionsrelevant eingestuft werden können. Dies gilt insbesondere für das stark, wenn auch oft nur latent, vertretene CtRLV-Isolat. Auch die negativ verlaufenen Bonituren der Weidenbestände und Wildapaceen in 2003, die in erster Linie auf der vorausgegangenen kalten Winterperiode 2002/03 beruhen, waren lediglich einer anholozyklischen Überwinterung und raschen Frühjahrsgradation abträglich, als dass das vermutete blattlausvermittelte Verbreitungsgeschehen des Ursachenkomplexes zum gegenwärtigen Zeitpunkt verworfen werden kann.

Die Befunde zum Auftreten symptomatischer Pflanzen in den zeitlich gestaffelten Netz-/Vliesaufdeckungen in den Standorten Hassel und Hebenshausen lassen sich ebenfalls mit der nötigen Vorsicht als mögliches Indiz für einen Eintrag von aussen in die Fläche auffassen. Am Standort Hebenshausen, mit fehlendem Möhrenerwerbsanbau, hatte die gezielte Einbringung symptomtragender Infektorpflanzen weder deutliche Auswirkungen auf die Entwicklung von Nachbarmöhren in der Reihe, noch auf den Bestand in den Gesamtparzellen. Abgesehen von den Einschränkungen bedingt durch die erforderliche Nachsaat des späten Termins und Beeinträchtigungen durch extreme Trockenheit, erbrachten jedoch auch die gezielt durchgeführten CtRLV-Inokulationen und Viruspassagen keine eindeutigen Ergebnisse (vergl. 4.1.2.) Folglich muss die wichtige Klärung der Vektorrolle von *C. aegopodii* offen bleiben.

Ebenso wird ein möglicherweise bodenbürtiger Übertragungsweg für das Beny-ähnliche Virus, für welches evtl. *Polymyxa betae* in Frage kommen könnte (vergl. 3.6), spekulativ bleiben und geklärt werden müssen. Bodenproben aus der unmittelbaren Wurzelumgebung wurzelbärtiger Einzelpflanzen sind für den Zweck von Keimlingsinokulationen an der Universität Kassel eingefroren worden. Aus Möhrensämlingen, die in solchen Böden angezogen worden waren, ließen sich jedoch keine „Beny“-ähnlichen Nukleinsäuren isolieren und amplifizieren.

8 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den Ökologischen Landbau; Möglichkeiten der Umsetzung

Der im Projektrahmen anberaumte sog. „Möhrentag“ im Januar 2004 in Visselhövede liess eine zunehmende Verunsicherung seitens der Praktiker bezüglich Verarbeitungsmöhren erkennen. Viele niedersächsische Betriebe werden in 2004 auf den Vertragsanbau „babynahrungstauglicher“ Verarbeitungsmöhren verzichten und werden überwiegend Frischmarktsorten anbauen. Materialengpässe für die Hersteller von Babynahrung sind deshalb absehbar. Trotz des hohen Klärungsbedarfes wird dennoch davon abgeraten, zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ hinreichend wirksame und praxistaugliche Massnahmen zu diskutieren, da die ursächlichen Zusammenhänge zur vorliegenden Symptomatik noch nicht aufgeklärt sind und die benötigten Diagnosemöglichkeiten noch nicht zur Verfügung stehen.

Auf jeden Fall sollte der empirische Weg beschritten werden, im Hauptproblemgebiet Sortenversuche anzulegen, um somit Daten zur relativen Anfälligkeit des gängigen Sortenspektrums von Verarbeitungs- und Frischmarktsortenmöhren zu sammeln. Dieser Umsetzungsempfehlung wird bereits in den für 2004 angelegten Sortenversuche unter der Leitung des Ökoring

(BLE-Projekt 030E488) nachgegangen (Rau pers. Mitt. 2003). Diese Ergebnisse, zusammen mit den im diesem Projekt erarbeiteten umfangreichen Erfahrungen, könnten im Rahmen von Feldtagen zusammen mit Praktikern weiterentwickelt und bereits im Folgejahr mit guter Perspektive in Form von Sortenempfehlungen umgesetzt werden. Parallel dazu wird die wissenschaftliche Begleitung und Fortführung der Forschungsanstrengungen zur Aufklärung des Ursachenkomplexes weiterhin als unverzichtbar angesehen.

9 Zusammenfassung

Die Möhre gehört zu den wichtigsten Gemüsekulturen im ökologischen Landbau. In verstärktem Maße wurden in den vergangenen 10 Jahren in Niedersachsen ein Zusammenspiel von 4 Symptomen in Möhrenbeständen beobachtet: Rot- bis Gelbfärbung des Laubes, kümmerlicher Wuchs der Herzblätter, starke Wurzelbärtigkeit, und sogenannte „Rattenschwänze“. In der landwirtschaftlichen Praxis wird die vorliegende Symptomatik bisher als „Möhrenröte“ bezeichnete, für welche nach Literaturlage aller Wahrscheinlichkeit nach Viruserkrankungen verantwortlich zu machen sind. Einige Betriebe mussten aufgrund der vorliegenden Problematik die Produktion von Verarbeitungsmöhren aufgeben. Im Projekt wurden die Teilziele Virusanalytik, Status-Quo-Analysen und Lösungsstrategien bearbeitet, wie folgt:

Virusanalytik: Das erste Teilziel bildete deshalb die Entwicklung geeigneter Diagnosemethoden für Virusinfektionen, was an der BBA-Braunschweig durchgeführt wurde. Es wurden Versuche unternommen, das Auftreten und die Verbreitung der im deutschen Möhrenanbau auftretenden Viruskrankheiten zu erfassen und über Virusreinigungen bzw. Expression viraler Hüllproteine serologische und über molekulare Charakterisierung RT-PCR basierte Nachweisverfahren zu entwickeln. Es konnten mindestens 8 verschiedene Viren identifiziert und teilweise charakterisiert werden, dabei das Luteovirus *Carrot red leaf virus* (CtRLV), die Umbraviren *Carrot mottle mimic virus/Carrot mottle virus*, das Closterovirus *Carrot yellow leaf virus*, der *Anthriscus*-Stamm des Sequivirus *Parsnip yellow fleck virus*, das Potyvirus *Carrot thin leaf virus*, ein bisher nicht beschriebenes Carlavirus und Vitivirus sowie ein Virus („Beny“-Virus), welches sich aufgrund der gewonnenen Sequenzinformationen in keine bekannte Gattung von Pflanzenviren einordnen lässt. Sequenzanalysen der Hüllproteingene verschiedener CtRLV-Isolate ergaben teilweise eine derart hohe Variabilität, die für das Vorkommen von wenigstens 2-3 verschiedenen Luteovirus-Arten in Möhren in Deutschland spricht. Das „Beny“-Virus und das CtRLV wurden am häufigsten nachgewiesen und schienen damit am weitesten verbreitet zu sein. Der hohe Anteil an latent CtRLV-infizierten, symptomlosen Pflanzen zeigt, dass offenbar noch andere Faktoren für die Symptomausprägung eine Rolle spielen.

Zum RT-PCR-Nachweis all dieser Viren wurden Primer entwickelt. Da das Ausmaß der Variabilität der meisten der hier untersuchten Viren wegen der begrenzten Projektlaufzeit (12 Monate) noch nicht ausreichend beurteilt werden kann, bedarf die universelle Brauchbarkeit der hier entwickelten RT-PCR-Primer der Überprüfung. Deswegen sind weitere Untersuchungen erforderlich. Dies gilt insbesondere für den Nachweis und die Charakterisierung (z.B., Vektorspezifitäten, Wirkkreisunterschiede) der hier beschriebenen CtRLV-Varianten. Gegen CTLV wurde ein gutes Antiserum nach Virusreinigung und Immunisierung eines Kaninchens hergestellt. Die Produktion eines konventionellen Antiserums gegen den *Anthriscus*-Stamm des PYFV ist begonnen worden. Während Versuche zur Herstellung von Antiseren gegen bakteriell exprimierte Virushüllproteine drei verschiedener CtRLV-Varianten aus unerklärlichen Gründen scheiterten, war es uns mit dem gleichen methodischen Ansatz jedoch möglich, ein gutes Antiserum gegen CYLV herzustellen. Da letzteres im Electroblood-Immunoassay starke und spezifische Reaktionen zeigte, scheint es auch für den Einsatz im ELISA geeignet zu sein, was im Sommer 2004 erprobt werden wird.

Status-Quo-Analysen: Das zweite Teilziel bildeten Erhebungen zur wirtschaftlichen Bedeutung der Symptomatik im Bundesgebiet. Im Möhrenanbaubereich zwischen Walsrode und Cloppenburg waren in 2003 erstmals auch Standorte ausserhalb der bisherigen Kernregion um Hassel/Eystrup betroffen. Im Mittel 5 beprobter Standorte wiesen symptomatisch eingestufte

Rübenkörper ein um ca. 30% reduziertes Gewicht auf. Entsprechend den Anteilen symptomtragender Pflanzen, insbesondere „rattenschwänziger“ Rübenkörper, wurden Ertragsverluste von 5,8% bis 17% ermittelt, was im letzteren Fall einem monetären Verlust von ca. € 600,-/ha entsprach. Qualitätseinbußen in Form nachteilig veränderter Mineralstoff- und Zuckergehalte waren in symptomatischen Erntestichproben nicht eindeutig erkennbar. Nach einer bundesweiten Berater-Umfrage des Ökorings wurden symptomtragende Pflanzen auch in anderen Bundesländern als wirtschaftlich relevantes Problem gemeldet.

Lösungsstrategien: Teilziel drei, Identifizierung möglicher Lösungsansätze zur Eingrenzung der Problematik, beinhaltete Feldexperimente in Niedersachsen und Nordhessen, in denen im Wesentlichen Aspekte zur Sortenwahl und Saatzeit untersucht, sowie Fragen zum vermuteten vektorvermittelten Infektionsgeschehen nachgegangen wurde. Verarbeitungs- mit Frischmarktmöhren ergaben entsprechend den Beobachtungen der Vorjahre eine überwiegend geringere Symptomanfälligkeit von Frischmarktmöhren. Da sich Letztere jedoch nicht als Verarbeitungsware eignen, wird weiterhin Bedarf an der Identifizierung weniger symptomanfälligen Verarbeitungssorten für den Vertragsanbau bestehen bleiben.

Bezüglich der vermuteten Vektorrolle der Gierschblattlaus *Cavariella aegopodii*, konnte eine starke Präsenz der Art im niedersächsischen Hauptproblemgebiet festgestellt werden. Die Erhebungen aus 2002/03 zur Anbaudichte, Schlagdistanzen und der Rolle potentieller Nebenwirte in der Begleitvegetation liessen aber keine eindeutigen Rückschlüsse auf besonders risikobehaftete Anbaukonstellationen zu. Deshalb kann auch die wichtige Frage zur Beurteilung der räumlichen Benachbarung von Selektions- und Samenträgerbeständen im Sinne einer Risikobewertung nicht beantwortet werden. Bis auf das vorgefundene CtRLV-Isolat aus Hassel, welches sich als *C. aegopodii* übertragbar bestätigte, muss der Stellenwert des Vektors für das Gesamtgeschehen offen bleiben. Die Ergebnisse zur Früh- und Spätsaat in Kombination mit zeitlich gestaffelten Netz-/Vliesabdeckungen erbrachten bezüglich der Koinzidenz von Vliesaufdeckung, Vektorfluggeschehen und Symptomausprägung in erster Linie 2002 methodisch bedingt, 2003 witterungsbedingt, keine eindeutig interpretierbaren Resultate.

Im gegebenen engen Zeitrahmen konnten die ursächlichen Zusammenhänge, die zu den Ertragsdepressionen und dem augenfälligen offenbar neuen Symptombild führten, nicht geklärt werden. Über die kontinuierliche Beobachtung der Symptomentwicklung in den betroffenen Möhrenanbaugebieten in 2004 hinaus, wird die wissenschaftliche Begleitung und Fortführung von Experimenten zur Aufklärung des Ursachenkomplexes empfohlen.

10 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

10.1 Arbeitsgruppe A: Virusanalyse

Als wichtigstes Ergebnis der Forschungsaktivitäten dieser Arbeitsgruppe ist die molekulare Charakterisierung von bis zu 8 an Möhren vorkommenden Viren anzusehen. Darauf aufbauend wurden Nukleinsäuretechniken (PCR) zum Nachweis dieser Viren entwickelt, mit denen sich dann Vorkommen, Verbreitung und Variabilität von Möhrenviren in der BRD bestimmen ließen. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass der virologische Wissenstand bei dieser Kultur noch sehr viel geringer war und noch immer ist als bei anderen Kulturen, wie z.B. der Kartoffel.

Dass es im Laufe des Projektes nicht möglich war, einen oder bestimmte Viren mit den im Feld auftretenden Symptomen eindeutig zu assoziieren, veränderte die Ausgangslage des Projektes grundlegend. Darüber hinaus zeigten schon die ersten Ergebnisse der molekularen Cha-

rakterisierung und des PCR-Nachweises von CtRLV-Isolaten, dass diese nicht nur ungewöhnliche Sequenzdiversitäten im Hüllprotein aufwiesen, sondern auch aufgrund von PCR-Tests nicht mit der „Möhrenröte“ assoziiert werden konnten. Die molekulare Analyse von Möhrenproben von verschiedenen Standorten und Wirtspflanzen legt nahe, dass ein einziger CtRLV-Typ nicht nur nicht in Apiaceen, sondern auch nicht in Möhren vorzuliegen scheint. Aufgrund der nun vorgelegten Daten kommen im deutschen Möhrenanbau wenigstens zwei verschiedene Polerovirus-Arten vor. Diese wiederum können genetisch in verschiedene Stämme differenziert werden, die vermutlich auch an unterschiedliche natürliche Wirtspflanzen adaptiert sind.

Außerdem wurden auch noch diverse andere Möhreviren gefunden und z.T. identifiziert (siehe 3, S. 27), von denen einige (z.B. das „Beny“-Virus) bisher noch nicht bekannt waren. So veränderte sich der Projektablauf dahingehend, dass nicht - wie ursprünglich geplant - nur die Sequenz eines einzigen Isolates bzw. weniger Isolate eines Virus (CtRLV), sondern vor allem die der neu entdeckten Viren entschlüsselt werden musste. So konnte letztendlich mindestens eine für die Taxonomie relevante Teilsequenz von jeder Spezies bestimmt werden. Nur so war es möglich, PCR-Methoden zum Nachweis dieser Viren in symptomatischen Möhren („Möhrenröte“) entwickeln zu können.

Da die unvorhergesehene Bearbeitung einer Vielzahl von CtRLV-Isolaten den ohnehin engen Zeitrahmen von 12 Monaten stark belastet hat, verzögerte sich die Entwicklung eines ELISA-Tests für CtRLV. Erst am 14.07.2003 wurde die Immunisierung von Kaninchen mit den Expressionsproteinen der drei CtRLV-Isolate begonnen. Da die gewonnenen Seren nicht befriedigten, wurde am 16.09.03 noch ein zweites Kaninchen mit dem bakteriell exprimierten Hüllprotein des CtRLV-Isolates Hassel immunisiert. Kurz vor Projektende (22.12.03) wurden dann noch Immunisierungsversuche mit gereinigten Viruspartikeln aufgenommen. Alle diese Versuche sind bisher weitgehend erfolglos verlaufen. Angesichts des nun vorliegenden Kenntnisstandes zur CtRLV-Variabilität scheint zudem die ursprüngliche Vorstellung, mit einem einzelnen Antiserum alle CtRLV-Isolate sensitiv nachweisen zu können, weitgehend unrealistisch zu sein. Obwohl CtRLV ein phloembürtiges Virus ist, das deswegen nur in geringen Konzentrationen in Blattextrakten vorliegt, könnte ein empfindlicher ELISA-Nachweis von unterschiedlichen CtRLV-Typen nach Mischung von verschiedenen CtRLV-Antiseren oder monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten möglich sein. Voraussetzung dafür aber wäre die erfolgreiche Reinigung von verschiedenen CtRLV-Typen.

Im Gegensatz zum CtRLV gelang für das in Hebenshausen gefundene und bisher nur aus Japan und Niederlande berichtete Carrot yellow leaf virus (CYLV, Closterovirus) die Herstellung eines guten Antiserums nach Immunisierung mit bakteriell exprimierten Hüllprotein. Dieses Antiserum wird demnächst bei der DSMZ angeboten. Das gilt auch für ein im Projekt erarbeitetes Serum für Carrot thin leaf virus (CTLV, Potyvirus).

10.2 Arbeitsgruppe B: Status Quo und Lösungsansätze zur Regulation

Die Eingrenzung von Hauptproblemgebieten konnte anhand der bundesweiten Umfrage und den zusätzlich durchgeführten Surveys in der Region Niedersachsen im vollen Umfang erbracht werden. Weiterhin liegen für die Saison 2003 in Niedersachsen wissenschaftlich absicherbare Daten zur Symptomentwicklung, Ertragsrelevanz und Qualitätsmerkmalen vor.

Die Konzeption der Feldversuche in Hassel und Hebenshausen war auf eine blattläusübertragene Viruskrankheit bei Möhren ausgerichtet, wobei die Möglichkeit von Massentestungen mittels ELISA für eines oder mehrere Agenzien eine wichtige Voraussetzung bildete. Aufgrund der hohen Kosten für die zeitintensive PCR-Analyse konnte nur eine Auswahl von 120 Feldproben auf das bis dahin bekannte Viren-Spektrum untersucht werden. Weitere Analysen

waren mit dem vorhandenen Budget leider nicht möglich. So konnten z.B. keine Angaben über den Infektionsstatus auf Parzellenniveau gemacht werden. Blattproben wurden aber für eine spätere Analyse konserviert. Bisher konnte weder eine Virose als massgeblich symptomverantwortlich identifiziert, noch die Rolle von *C. aegopodii* als mutmasslicher Hauptvektor beurteilt werden.

Die vom Ökoring Niedersachsen organisierte, gut besuchte Tagung zur Problematik „Möhrenröte“ vervollständigte das Bild zur Symptomatik und ermöglichte die Erörterung des Sachstands und den Gedanken- und Informationsaustausch zwischen Praktikern, Verarbeitern, Züchtern, Beratern und Phytopathologen. Aus den Beiträgen und Einschätzungen liessen sich keine gesicherten Empfehlungen zum Umgang mit dem vorliegenden Problem ableiten.

Seitens der BBA wurden Ergebnisse zur Charakterisierung und zum Nachweis des *Carrot yellow leaf virus* auf den Jahrestagungen des DPG-Arbeitskreises für Pflanzenvirologie im März 2003 und 2004 vorgestellt.

Für September 2004 sind 2 separate Vorträge (Virologischer Teil und Symptomatik) im Rahmen der Pflanzenschutztagung 2004 in Hamburg angemeldet worden.

Tab. 16: Zeithorizont, Zielerreichungsgrad und Modifikation im Projektablauf

Punkt	Teilprojekt	Titel	geplant	erreicht	zusätzlich erreicht
	1	Beginn Virusnachweis	10'02	1'03	
	1	Beschaffung der Sequenzen weiterer an Möhre vorkommender Virose			bis 9'2003
	1	PCR-Testung der eingesendeten Proben auf die nachgewiesenen Viren			9'2003
	1	Isolierung und Aufreinigung von Antigen für Immunisierungen	bis 9'2003	z.T. 12'2003	
	1	Herstellung und Reinigung von Enzymkonjugaten	bis 9'2003	*	
	1	Optimierung und Validierung von Testsystemen	bis 9'2003	*	
	1	Gewinnung von Antikörpern für den späteren Einsatz im ELISA	12'2003	*	
	1	molekulare Charakterisierung der Markersequenzen der nachgewiesenen Virose			12'2003
	1	ELISA-Testkit für CtRLV	bis 9'2003	*	
		ELISA Testkit für CTLV und CYLV			12'2003
	1	Massentests mit ELISA	bis 12'2003	*	

Punkt	Teilprojekt	Titel	geplant	erreicht	zusätzlich erreicht
	2	Räumliche Erfassung der Möhrenanbaudichte des Betriebes Kramer	ab 10'2002	3'2003	
	2	Beprobung der betroffenen Betriebe in Niedersachsen			8'2003
	2	Hauptverantwortliche Nebenwirte erfassen	bis 8'2003	z.T. 8'2003	
	2	Analyse ursächlicher Zusammenhänge, Ableitung und Anwendung von Gegenmaßnahmen	bis 9'2003	*	
	2	Winter- u. Nebenwirtkontrolle	bis 9'2003	9'2003	
	2	bundesweite Umfrage zum Befallsstatus	10'2002	10'2003	
	3	Planung Feldversuche	bis 12'2002	12'2002	
	3	Ernte, Einlagerung von Infektorpflanzen, und Auswertung des Versuches Hassel 2002			10'2002
	3	Anlage Feldversuche	4'2003	4'2003	
	3	Erfassung kritischer Infektionsphasen	bis 9'2003	bis 10'2003	
	3	Bonitur markierter, auffälliger Pflanzen in den Versuchen Hassel und Hebenshausen			10'2003
	3	Ernte und Einlagerung von Rückstellproben und Infektorpflanzen der Versuchsstandorte Hassel und Hebenshausen 2003	Bis 9'2003	10'2003	
	4	Vorstellung der Versuchsergebnisse im Rahmen einer Informationsveranstaltung zum Gemüsebau im Kompetenzzentrum Ökolandbau, Visselhövede	Bis 12'2003		1'2004
	4	Auswertung der Bonituren	12'2003	4'2004	
	4	Endbericht erstellt	12'2003	4'2004	
	4	Publikationen im Rahmen der Pflanzenschutztagung 2004			9'2004

* nicht erreicht wegen unerwarteter Projektergebnisse und Anpassung des Projektablaufs

11 Weiterführende Fragestellungen

Aufgrund der wesentlich vielschichtiger vorgefundenen Gesamtsituation wird an der Aufklärung des Ursachenkomplexes weiter gearbeitet werden müssen. Die Entwicklung weiterer ELISA-Nachweise für am Symptombild beteiligte Viren, als Voraussetzung für kostengünsti-

ge Massentestungen, sollte fortgeführt werden. Damit könnten die wertvollen Rückstellproben aus den Feldversuchen 2002/2003 nachträglich aufgearbeitet und die in Erprobung befindlichen Gegenmaßnahmen beurteilt werden.

Bezüglich der am Gesamtgeschehen vermuteten Vektoren sollte über die Testung von Viruspassagen mit *C. aegopodii*, auch die theoretisch denkbare bodenbürtige Übertragungsmöglichkeit über *Polymyxa betae* mit den im Projektrahmen eingelagerten Bodenrückstellproben im Rahmen von Gewächshausexperimenten geprüft werden. Mit der erhofften Identifizierung beteiligter Agenzien und ihrer Vektoren könnte dem grundlegend notwendigen Forschungsbedarf zur Aufklärung der Symptomentwicklung, wie Setzung zeitlich gestaffelte Infektionen an unterschiedlich alten Keimlingen verschiedener Möhrensornten unter Feld- und Laborbedingungen nachgekommen werden.

Auf jeden Fall sollte aber, unabhängig vom Ursachenkomplex, der empirische Weg beschritten werden, im Hauptproblemgebiet Sortenversuche anzulegen, um somit Daten zur relativen Anfälligkeit gängiger und neuer Sorten von Verarbeitungs- und Frischmarktsortenmöhren zu sammeln. In 2004 angelegte Sortenversuche unter der Leitung des Ökoring (BLE-Projekt 030E488) sollten explizit auch unter diesem Aspekt ausgewertet werden, wobei in Zukunft insbesondere neuere US-amerikanische Sorten (Infinity, Boston u.a.) Berücksichtigung finden sollten (Rau pers. Mitt. 2003). Diese Ergebnisse, zusammen mit den im diesem Projekt erarbeiteten umfangreichen Erfahrungen, könnten im Rahmen von Feldtagen zusammen mit Praktikern weiterentwickelt und bereits im Folgejahr mit guter Perspektive in Form von Sortenempfehlungen umgesetzt werden.

12 Literaturverzeichnis

- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.
- Brunt, A.A., Foster, G.D., Morozov, S.Y., Zavriev, S.K., 2001. Carlavirus, pp. 969-975. In: van Regelmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
- Che, X., Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., 2003. Defective RNAs of Citrus tristeza virus analogous to Crinivirus genomic RNAs. *Virology* 308, 298-309.
- Clark, J.M., 1988. Novel non-templated nucleotide reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 16, 9677-9686.
- Crüger, G.; Backhaus, G.F., Hommes, M., Smolka, S., Vetten, H.J. 2002. *Pflanzenschutz im Gemüsebau*. 4. Stuttgart, Ulmer.
- D'Arcy, C.J., Domier, L.L., Mayo, M.A., 2001. Luteoviridae, pp. 775-784. In: van Regelmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
- De Bokx, J.A.; Piron, P.G.M., 1985. Aphid trapping in potato fields and transmission of potato virus YN. *Med.Fac.Landbouw.Rijksuniv.Gent* 50 (2b), 483-492.
- De Bokx, J.A.; Piron,P.G.M., 1990. Relative efficiency of a number of aphid species in the transmission of potato virus Y. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 237-246.
- Döring, T., Saucke, H., 2001. Viruserkrankungen im Ökologischen Pflanzkartoffelbau - Perspektiven kulturtechnischer Gegenmassnahmen. In: Reents, H. R. (Eds.), *Beiträge zur 6.Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau*, 6.-8.März 2001 Freising-Weißenstephan, 261-264.
- Dunn, J. A., 1965. Studies on the aphid *Cavariella aegopodii* Scop. I. On willow and carrot. *Annals of Applied Biology* 56, 429-438.
- Dunn, J. A., Kirkley, J., 1966. Studies on the aphid *Cavariella aegopodii* Scop. II. On the secondary hosts other than carrot. *Annals of Applied Biology* 58, 213-217.
- Elnagar, S., Murant, A.F., 1976. Role of helper virus, Anthriscus yellows, in transmission of Parsnip yellow fleck virus by the aphid *Cavariella aegopodii*. *Annals of Applied Biology* 84, 169-181.
- Elnagar, S., Murant, A. F. 1978a. Aphid-injection experiments with carrot mottle virus and its helper virus, carrot red leaf. *Annals of Applied Biology* 89: 245-250.
- Elnagar S., Murant A. F. 1978b. Relations of carrot red leaf and carrot mottle viruses with their aphid vector, *Cavariella aegopodii*. *Annals of Applied Biology* 89: 237-244.
- Fleck, M., Sikora, F.; Rohmund, C.; Gränzdröffer, M., von Fragstein, P., Heß, J. 2002. Samenfeste Sorten oder Hybriden - Untersuchungen an Speisemöhren aus einem Anbauvergleich an zwei Standorten des Ökologischen Landbaus>.Hannover: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. p. 167-172.

- Fleck, M. 2003. pers. Mitteilung 10.06.2003, Fachgebiet Ökologischer Land- und Pflanzenbau, Univ. Kassel, 37213 Witzenhausen
- Froussard, P., 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research* 20, 2900.
- Gibbs, M.J., Cooper, J.I., Waterhouse, P.M., 1996b. The genome organisation and affinities of an Australian isolate of carrot mottle umbravirus. *Virology* 224, 310-313.
- Gibbs, M.J., Ziegler, A., Robinson, D.J., Waterhouse, P.M., Cooper, J.I., 1996a. Carrot mottle mimic virus (CMoMV): A second umbravirus associated with carrot motley dwarf disease recognised by nucleic acid hybridisation. *Molecular Plant Pathology On-Line*, www.bspp.org.uk/mppol.
- Green, K.Y., Berke, T., Matson, D.O., 2001. Hepatitis E-like viruses, pp. 735-739. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
- Heie, O.E., div. Jahrg. *Fauna Entomologica Scandinavica*. Scandinavian Science Press LTD, Klampenborg.
- Holton, T.A., Graham, M.W., 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research* 19, 1156.
- Koike, S.T., Nuñez, J.J., Falk, B.W., 2002. Carrot Mottley Dwarf, in Davis, R.M. and Raid R.N. (eds), *Compendium of Umbelliferous Crop Diseases*. Minnesota USA, 51-59.
- König, R., Lesemann, D.-E., 2001. Benyvirus, pp. 917-922. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, E.A., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 8259-8263.
- Kundu, R., Dixon, A. F. G., 1993. Do host alternating aphids know which plant they are on? *Ecological Entomology* 18, 61-66.
- Lowe, A. D., 1971. Avoiding damage by aphids (Homoptera) in carrot crops. *New Zealand Entomologist* 5: 49-51.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Flak, B.W., Gonsaves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., Yoshikawa, N., 2002. The Family Closteroviridae revised. *Archives of Virology* 147, 2039-2044.
- Meier, U., 2001. *Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen: BBCH Monografie*. Braunschweig.
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiß, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99, 81-92.
- Menzel, W., Vetten, H.J., 2003. Erste Ergebnisse zur Charakterisierung eines Viruskomplexes an Möhre. *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* 2, 36-37.

- Morozov, S.Y., Solovyev, A.G., 2003. Triple gene block: modular design of multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* 84, 1351-1366.
- Müller, F.P., 1975. Bestimmungsschlüssel für geflügelte Blattläuse in Gelbschalen. *Archiv Phytopathologie und Pflanzenschutz* 11, 49-77.
- Murant, A.F., 1974. Carrot mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 137.
- Murant, A.F., 2003. Parsnip yellow fleck virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 394.
- Paffrath, A., 2003. Möhren-Sortenprüfungen 1997-2002. *SÖL-Berater-Rundbrief* 13-16.
- Paffrath, A., Leisen, E., 2002. Möhrensorntenversuche im Ökolandbau (Rheinland und Westfalen). *SÖL-Berater-Rundbrief* 33-38.
- Rau, F., 2001. Die Möhrenröte, ein Problem des intensiven Industriemöhrenanbaus. *ÖKÖmischer Gärtner-Rundbrief - Brandenburger Gärtnerbriefe*, 20-21.
- Rau, F., 2002/03. pers. Mitteilung, Ökoring Niedersachsen, 27374 Visselhövede.
- Rau, F., Buck, H., 2003. Vergleich von 180-Tage-Sorten (Industriemöhren) und 120-Tage-Sorten (Frischmarktmöhren) bezüglich Virusanfälligkeit (Möhrenröte) auf Praxis schlägen. In *Versuche im niedersächsischen Öko-Gemüsebau 2002 - Ergebnisse, Analysen, Empfehlungen*, pp. Kompetenzzentrum Ökolandbau Niedersachsen 59-75.
- Rieckmann, W., 2003. Lageberichte zur Blattlausentwicklung 2003, Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover.
- Sanger, F., (1982): Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology* 162, 729-773.
- Schmiegel, S., 2002. Untersuchungen zu den Wirkungen vier natürlicher Behandlungsmittel auf den Befall von Möhrenpflanzen mit *Cavariella aegopodii* Scop. als Virusvektor der Möhrenröte. Diplomarbeit, Universität Kassel.
- Smith, H. C., 1960. Control of motley dwarf virus disease in carrots. *N.Z.Com.Grower* 16: 13-14.
- Stubbs, L. L., 1948. A new virus disease of carrots: its transmission, host range, and control. *Australian Journal of Scientific Research B1*, 303 -322.
- Taylor, L.R., 1984. A handbook for Aphid Identification.
- Ullrich, 2001. pers. Mitteilung, HLDLGN, Pflanzenschutzdienst Wetzlar
- Valverde, R.A., Dodds, J.A. und Heick, J.A., 1985. Double-stranded nucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* 75, 1357-1367.
- van Dijk, P., Bos, L., 1985. Viral dieback of carrot and other Umbelliferae caused by the anthriscus strain of Parsnip yellow fleck virus, and its distinction from carrot motley dwarf. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 91, 169-187.
- van Dijk, P., Bos, L., 1989. Survey and biological differentiation of viruses of wild and cultivated Umbelliferae in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95, Supplement 2, 1-34.
- Vercruyse, P.; Gibbs, M.; Tirry, L.; Höfte, M., 2000. RT-PCR using redundant primers to detect the three viruses associated with carrot motley dwarf disease. *J. Virol. Meth.* 88,153-161.

- Waterhouse, P.M., Murant, A.F., 1982. Carrot red leaf virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 249.
- Watson, M., Serjeant, E. P., 1964. The effect of motley dwarf virus on yield of carrots and its transmission in the field by *Cavariella aegopodii* Scop. *Annals of Applied Biology* 53, 77-93.
- Watson, M.T., Falk, B.W., 1994. Ecological and epidemiological factors affecting carrot motley dwarf development in carrots grown in the Salinas Valley of California. *Plant Disease* 78, 477-481.
- Yamashita, S., Ohki, S.T., Doi, Y., Yora, K., 1976. Two viruses of yellows-type from carrot. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 42, 382-383.

13 Danksagung

Unser Dank gilt:

- Dr. D.-E. Lesemann (Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Braunschweig) für die umfangreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen.
- Dr. Rabenstein (Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben) für die zur Verfügung gestellte Ausgangspopulation der Gierschblattlaus und das Antiserum und die zugehörige Virusreinigung des Dillisolates des CtRLV.
- Dr. Falk (University of California, Davis, USA) für das zur Verfügung gestellte kalifornische Isolat und Serum des CtRLV aus Möhre, welches auch mit CMoMV infiziert war.
- Frau Prof. Dr. Höfte (Universität Gent, Belgien) für die zur Verfügung gestellten unveröffentlichten Sequenzen der belgischen und britischen Isolate des CtRLV und CMoV.
- Dipl. Landschaftsökol. Thomas Döring (Universität Kassel, FG Ökologischer Pflanzenschutz) für die taxonomische Bestimmung der vielen Tausend Einzelexemplare geflügelter Blattläuse in Gelbschalen auf Artniveau.

14 Anhang

14.1 Sequenzierergebnisse der Viren

Die Sequenzen sind um Vektorsequenzen bereinigt in 5'-3'-Orientierung angegeben.

14.1.1 Carrot red leaf virus:

14.1.1.1 CtRLV CP Hassel aus Möhre

Sequenz (1664 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.1.2 CtRLV CP Californien aus Möhre

Sequenz (615 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.1.3 CtRLV CP Aschersleben aus Dill

Sequenz (627 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.1.4 CtRLV CP BBA Braunschweig aus Kümmel

```

1 AAACCCATGG TCGTTGTCAA CCCATCTTCG CGGCGCCCAC GTCGACGTGT TCAATCAAAG
61 CAGGTCGTTG TGGTTGCAGC CCCTACAAC TGGACGAAGAA GACGAGGAAG GAGGGGACGC
121 GGTAAGCGTA ACCCAGGAGC AATTGGCGGA TCCGGAAGCG GAATTGTACG CCAACAGTTC
181 ACTTTTTTCGA AAGACAACAT CAAGGGCAAC TCCTCTGGAG TCATCACCTT CGGCAAGGAC
241 CTATCAGACC ACCCAGCTTT TAGCAAGGGA GTACTCACAG CGTACCATGA ATATAAGATC
301 ACAAACGTGC GAGT

```

14.1.1.5 CtRLV CP BBA Braunschweig aus Riesenbärenklau

```

1 AAACCCATGG TCGTTGTCAA CTCATCTTCG CGGCGCCCAC GTCGACGTGT TCAATCAAAG
61 CAGGTCGTTG TGGTTGCAGC CCCTACAAC TGGACGAAGAA GACGAGGAAG GAGGGGACGC
121 GGTAAGCGTA ACCCAGGAGC AATTGGCGGA TCCGGAAGCG GAATTGTACG CCAACAGTTC
181 ACTTTTTTCGA AAGACAACAT CAAGGGCGAC TCCTCTGGAG TCATCACCTT CGGCAAGGAC
241 CTATCAGACC ATCCAGCTTT CAGTTCAGGA ATTCTCAAAG CCTTCCATGA ATATAAGATC
301 ACAAACGTGC GAGT

```

14.1.1.6 CtRLV CP Löhne aus Möhre

```

1 ATCACGTTTCG GGCCGAGTCT ATCAGACCAC CCAGCTTTCA GCTCGGGACT TCTCAAGGCC
61 TTCCATGAGT ATAAGATCAC AAACGTGCGA ATTATATTCA AGTCGGAAGC CCCATCCACC
121 ACCGGCGGTT CACTCGCTTA TGAGTTGGAC CCCCCTGCG AACTTACTGC ACTCTCAAGC

```

181 AAGATCTTTA AGTTTGGAGT CACAAAAGGC GGACAGAAGA CCTGGGCTGC TGAAAAGATT
 241 AACGGGAAGG ATTGGCACTC CTCAACAGAG AACCAATTCC GATTCTATG GAAAGGAAAT
 301 GGTGATAGTA CACAAGTAGG ATCATTTCGAA ATCCATTACA CCTGCTTGTT CCACAACCCC
 361 AAATAGGTCTG ACGCGTGA

14.1.1.7 CtRLV BBA Braunschweig aus Petersilie

1 CCATCCAGCT TTCAGTTCAG GAATTCTCAA AGCCTTCCAT GAGTATAAGA TCACAAACTT
 61 GCGAGTTATA TTCAAGTCGG AAGCCCCATC AACCACCGGC GGGTCGCTCG CTTACGAGCT
 121 GGACCCCCAC TGCGAGCTTA CTAGCCTCTC AAGTAAGATC TACAAGTTCG GAGCAACAAA
 181 AGGTGGTCAG AAAACCTGGA CTTCTAAAGA GATTAACGGG ACGGAGTGGC ACTCCTCTTC
 241 GGAGAACCAA TTCCGGCTCC TCTACAAAGG AAATGGTGAT AGTACACAAA TAGGCTCTTT
 301 TGAGATACAC TATACAGTGT TGTTTCACAA TCCCAA

14.1.1.8 CtRLV Hebenshausen aus Möhre

1 CCATCCAGCT TTCAGTTCAG GAATTCTCAA AGCCTTCCAT GAGTATAAGA TCACAGACTT
 61 GCGAGTTATA TTCAAGTCGG AAGCCCCATC AACCACCGGC GGGTCGCTCG CTTACGAGCT
 121 GGACCCCCAC TGCGAGCTTA CTAGCCTCTC AAGTAAGATC TACAAGTTCG GAGCAACAAA
 181 AGGTGGTCAG AAAACCTGGA CTTCTAAAGA GATTAACGGG ACGGAGTGGC ACTCCTCTTC
 241 GGAGAACCAA TTCCGGCTCC TCTACAAAGG AAATGGTGAT AGCACACAAA TAGGCTCTTT
 301 TGAGATTAC TATACAGTGT TGTTTCAAAA CCCCAAA

14.1.1.9 CtRLV Weddel aus Petersilie

1 CCATCCAGCT TTCAGTTCAG GAATTCTCAA AGCCTTCCAT GAGTATAAGA TCACAAACTT
 61 GCGAGTTATA TTCAAGTCGG AAGCCCCATC AACCACCGGC GGGTCGCTCG CTTACGAGCT
 121 GGACCCCCAC TGCGAGCTTA CTAGCCTCTC AAGTAAGATC TACAAGTTCG GAGCAACAAA
 181 AGGTGGTCAG AAAACCTGGA CTTCTAAAGA GATTAACGGG ACGGAGTGGC ACTCCTCTTC
 241 GGAGAACCAA TTCCGGCTCC TCTACAAAGG AAATGGTGAT AGCACACAAA TAGGCTCTTT
 301 TGAGATTAC TACACAGTGT TGTTTCACAA TCCCAA

14.1.1.10 CtRLV RdRp Großbritannien aus Möhre Accession AAQ00930

sryrlimsvs lldqlvarvl fqsqnkleia lwravpskpg fglstdnqie nfvdcclakqv
 getpeevian wpyliptdc sgfdwsvsdw lledmevrn rltidctpll krlragwlkc

14.1.1.11 CtRLV RdRp Großbritannien aus Möhre Accession AX404765

FDRLQKISEV NFSDMTPEEL VQNGLCDPIR LFVKGEPHKQ SKLDEGRYRL IMSVSLLDQL
 VARVLFQSQN KLEIALWRAV PSKPGFGLST DNQIENFVDC LAKQVGETPE EVIANWPKYL

IPTDCSGFDW SVSDWLEDD MEVRNRLTID CTPLLRLRA GWLKCISNSV LCLSDGTLA
QTIPRGSEEW IV

14.1.1.12 CtRLV RdRp Aschersleben aus Dill

GGADKQSKLD EGRYRLIMSV SLLDQLVARV LFQSQNKLEI ALWRAVPSKP GFGLSTDGQI
EDFTDCLAKQ VGVTPDEAIE NWKEYLVPTD CSGFDWSVSD WLEDDMEVR NRLTINCSP
LRRLRAGWLK CISNS

14.1.1.13 CtRLV RdRp Hassel aus Möhre

MSVSLLDQLV ARVLFQSQNK LEIALWRAVP SKPGFGLSTD TQIEDFTSCL AKQVGETADE
VILNWQNYLV PTDCSGFDWS VSDWLEDDM EVRNRLTINC TPLLRLRAG WLKCISNSVL
CLSDGTLA Q TVPGVQKSGS YNTSSNSRI RVMAAYHSGA SWAMAMGDDA LESKNTDLSV
YKDLGFKVEV SAQLEFCSHI FKERDLAIPV NTNKMPLYKLI HGYEPECGNI EVLNNYLNAV
VSIMGELRHD QALVSQLFQW LVPSAATK

14.1.1.14 CtRLV RdRp Kiel aus Möhre

VARVLFQSQNK LEIALWRAVP PSKPGFGLST DNQIENFVDC LAKQVGETPE EVIANWPKYL
IPTDCSGFDW SVSDWLEDD MEVRNRLTID CTPLLRLRA GWLKCISNSV LCLSDGTLA
QIVPGVQKSG SYNTSSNSR IRVMAAYHS

14.1.1.15 CtRLV RdRp BBA Braunschweig aus Petersilie

SKPGFGLSTD GQIEDFTDCL AKQVGVTPDE AIENWKEYLV PTDCSGFDWS VSDWLEDDM
EVRNRLTIDC SPLLRKLRAG WLKCISNSIL CLSDGTLA Q TKPGVQKSGS YNTSSNSRI

14.1.2 Carrot mottle mimic virus:

14.1.2.1 CMoMV Bingenheim

Sequenz (3957 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.2.2 CMoMV Californien

Sequenz (3655 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.3 Carrot yellow leaf virus:

14.1.3.1 CYLV Bingenheim

Sequenz (11.847 Nukleotide) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.3.2 CYLV CP Hebenshausen

Sequenz (621 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.4 Parsnip yellow fleck virus:

14.1.4.1 PYFV Sequenz 1

```

1 CCATTGCACA AGAGGAGTAT TGAGGAACAA GTTTACTGGA TCCGTGAAGG AGGTGACTCT
61 CTTGCCTTGC TAGAAGCTAA CATTGAGAAT GCAATGTATG AGGCGCACCA CCATGGTAGA
121 GAGTACTATG ATGAGCTTAA AGTTCAAATA AAGAATGCCA TGTTTAAAGC GGGCTACACT
181 AACTTTGTTG CTCCCCTTTT CCTAATGTGT AGACAAAGGT GGCTACATCA GGACTTGGGA
241 GAGGTTTCGA CTTCTTCCCT GCCATCTCAT GTAGGTCTTC TCAAAGAGGC CTTCAAAAAT
301 AGTTTGACCA CTGAGCTGGA TGAATGTGAC ATATTTGCAC ACTTTGATGA AGTCCAGAAT
361 TCGAATGGAG GAATAACAAG ACATGGACCT CTTCAAAAAGA TAATGCCTGG CGTGTTTATT
421 GGTCCGAGTG GGGTCTTCGA AAAGAAGTTT GGTGTGGGCT TGTTCAATCT TGTATGCGAT
481 AACTCCTTGA GTAGAGGTCA AACCCGTTAT GCGGTGAAGC ATGGCATCAT GAGCCTCCAG
541 AAACCAGACT TCTCTTACAT CTCTGAAAGT TTGCCTTCCT TGATGTGTGA GAGCTTCAAG
601 TTAATCTGTC TGGATCCAAT AGGAGGAGAG TTGGCCATCG CCACAGCTTT ATGCTTGGCT
661 CATGCTGCTG GCATAGTTAG GACGAATGCT TTCTGTAGGT CAATGCGACT CTATGTAAAT
721 CAATGGAAGC ATGTTCTACA GGCTTATTTT AGAGTGAGAG ACACGCATGT TGGCAAGGAG
781 TGGGACGTGT GTTCTAGAGA CATACCAAG AATAATATTG GATGCTCTAG GACCACGGCT
841 GTGGGTTCAA AATATCTGAC TATTCAAGGA CAACCCCGGT ATGTG

```

14.1.4.2 PYFV Sequenz 2

```

1 TGCACAAATG GAGGATTGGG AAACTTTCAT GGTTCGGGAA AACTACAACA CCATAGATCT
61 TCCCATGCAT ACAATCATAA ATGGCATCAG TGGGGTGGAA TACTATGAGC CGTTGAACAT
121 GTCCACGAGT GAGGGCTATC CCTTGATCTT GTCGAGACCG CCAGATGCGC ATGGAAAAGGA
181 ATACCTCTTC GAGAATTGTG AAGATGGGTC TCGTGCCATT AAAAGTTCCA AGTTGAGCTC
241 GAATTATGAG GCATATGGGA GTGCTTTAGC CAGTGGGGAT CCCTTCCCCT TAATCTCAAT
301 TGAGTGCCCC AAAGATGAAA GGAGAGCATT GGACAAGATC TATGACAACC CCAAGACCAG
361 ATTGTTTTCT ATTTTGCCTG TTGAATTCAA TATGCATGCT AGGAGGCTCT TCCTTGATTT
421 CAATGTTTTT GTTATGGCAA ACAGACATAA GCACGGTATT ATGGTGGGCA TAAATCCCCA
481 CTCTCGTGAA TGGTCAGATC CGGCTATTTT CCTTGCTTCC TTCTCCCCTT ACGGCTTTAA
541 TGGAGACTTT GCCAATTTTG ACGGTATGTT CCATCCCCTT CCCTTGATAT GGTATCCGAG
601 CTAG

```

14.1.5 Carrot thin leaf virus:

```

1 AACAGTTGTG GACAACACAC TCATGGTAAT TATAGCTTTA TATTATTCAC TCCATGAGCT
61 AGGATATGAG AGATCCCAGT TCGACCACGT TTGCAAATTC TTCGTGAATG GTGATGATTT

```

121 AATCATAGCT GTTAATCCAA GCGAAGTTCG GATGCTAGAT GAGTTACAAC AGTTGTTTAA
 181 GCAGTTGGGT CTGAACTATG ACTTTTCATC GCGAACACAT GACATAAAAAG AGCTATGGTC
 241 CATGTCACAC CAAGGAACGG AACGAGAAGG CAAGCTTATA CCCAAGTTGG AGATAGAAAAG
 301 GATCGTGTCC ATTCTTGAAT GGGATAGATC TACAGAACCG GAGCATAGAT TGGAAAGCAAT
 361 TTGTGCATCT ATGGTTGAAG CATGGGGTTA TGAAGTGGTA ATTCACGAGA TTAGGAAAAT
 421 TTACAGTTGG GTTTTGGAAC AATTCCATA CAATGAATTG GCCACACAAG GGAGAGCACC
 481 ATACATAGCT GAGACTGCCT TGAGGAAATT GTATCTAGAT GTTGATGCCA CAATAGAAGA
 541 ATTGGAAGTG TATGGAGACA TATTTTCAGT GGATGAAGAA GATGAGGAAA CTGTTTACCA
 601 CCAGGAAGAC AAGAAGACAA GGATGCTGAC AAAGTAATGG ATGCTGGGAT TGGTATTCCA
 661 CCAAAAGATA AAGGGAAGAA TACTGAGACT GATGCAAATA AGCAACTTGC AGCAAGCAAA
 721 GATAAGGATG TGAATGTGGG AACTAGTGGG ACTTTTTTCAG TTCCTAAGCT CAAAGGCATG
 781 GCATCAAAAA TGAGACTACC AAAGTTAGA GGGAAAACAG TTTTGAATCT GGATCACTTG
 841 ATACAGTACA ATCCGGAGCA AACTGATCTA TCAAATACAA GATCAACACA CAACCAATTT
 901 AACAATTGGT ATGATGGTGT TAAGAAGGAT TATGAACTCA ATGATGATCA AATGGAAAATC
 961 ATAATGAATG GTCTCATGGT ATGGTGCATA GAAAATGGTT GTTCCCCAAA CATAAATGGA
 1021 ATGTGGGTGA TGATGGATGG TGAGGAACAG ATAGAGTACC CAATAAAACC ATTGATTGAT
 1081 CACGCCAAAC CTACATTTTCG CCAGATAATG GCCCATTTCA GTGACGCCGC TGAAGCGTAC
 1141 ATTGAAAAGA GAAATGCTGA AAAAGCATAC ATGCCCAGAT ATGGGCTTCA GCGCAACTTA
 1201 AACGATCCGA GTCTTGCACG TTATGCGTTC GATTTCTACG AGATGACTGC AAAGACACCA
 1261 AATAGAGCTA GGAAGCCCA CCTGCAGATG AAGGCGGCAG CTCTAAGAAA TGCTAGTAAC
 1321 AAGTTATTTG GCATAGATGG AAAGGTGAGT TCACAGGAAG AGGACACGGA AAGGCACACC
 1381 ACTGATGATG TGAATCGGAA CATGCATAGC ATGCTTGGCG TGCCTACTAT GTAATGGGTT
 1441 TGTCTTGATA TTCGATATAA GAATTTCCGT AGTATCCTCT CTGTTTTATT ATAGCATCGT
 1501 ATAATATCGA GCTTGTCTTT TTGACCTGGC GTAGTGTTTG CTTCAAACGT GTCAGTGCCT
 1561 GACTTCAATC ACTAG

14.1.6 Benyvirus:

Sequenz (7180 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.7 Carlavirus:

14.1.7.1 >Carla Bingenheim

Sequenz (2235 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.7.2 >Carla Braunschweig

Sequenz (561 nts) auf Anfrage erhältlich (h.j.vetten@bba.de)

14.1.8 dsRNA-Viren:

14.1.8.1 dsRNA-Virus I

1 TAGTTGTATA TGTCATTAAG TACCCATAAT ACGCGTTGT GGTGCCACA GCTAGCATAG
61 GCGAAACCTA TTGCTTGAGC CATGGTTATC TCAGGTGTGG GATCTCTTGC TTTAGTGTGA
121 TAGAATTGAG CAAGCATGTT GATCTCATCA CGGTGAGGGA AACCGTTGTG ATTGCGATAA
181 GAGAGTACTT CACGACCATT AAGTGTATTG GCTACTTCGG ACTTCTT

14.1.8.2 dsRNA-Virus II

1 TTTCGAATAT ATTGGGAACT TCTCCCTACC TCCAGGCTTG CTCCGTGTCA ATGACACTGC
61 AATTTCTAAT CATAAGAAAA CTCTGGAACA TTCTTTCAGC AAATACCTCT ATGCTGATGA
121 GATTCATCTC ATCACTAAAG AATACCGTCG ATCTGATATC GATCTTGATT CAATTCCTGA
181 CGACTTCTTC TCTGGCGATG TTGAAAAATT TGAAATTCCA TTCGACGAAC ACGTCGAAAC
241 AGGTTTACGC TGCATGGCTG ACGCCTTCCG TCCGCCAAGA CTCTGCCGCC CAGCTCACAT
301 CCTTGATGTG AAGCATCACT ACCCTTACAA GTGGAACGTC AATGCAGAAC CACCCTTCTC
361 AACTGACGAA TACTTCCTCA CACAACGTAA G

14.1.8.3 dsRNA-Virus III

1 GGATCGATAG TAGTACGTCG TCACCATTAT GTACCGAATC AACCACGCCA GGTGTTCAA
61 GTGCCTTCGA TATCTTAAAA TAGATGTAAT TTAGCACCGT GTTCATGAAA GTAGTTAACC
121 GCCACCCTGA CAGTAGTGTT CCGTTCAACT TGTACCTGTC CGGCGGGCTC ACTTCATTGT
181 TGTTGACGAT CATATTGTCC ACACTATCAC ATACCCACTC CATTGCTCTG ATTTGGTTGA
241 TATCCATATC AGGCTTAAAC TCGTCGTAAT AAGCGTATAA TACTGATTTT ATGGATGATG
301 TCGCGTGCTG TGCATTGAAA TCATCAAAAT CATAACAGAA CGACTCAGTA TCTTTAAGCA
361 TATATGTGAG CCTCTTGTGA ACTCTGGTGG CGTCTGCTTC AGATCCTATC GGAAAGTGGT
421 GTCGCAAGAC GTCTTCACAC CTAAACATGG CATAGTTAGT TATAACTGAG CTAGTCAGAT
481 CAACCCCGTA TATAGCCCTT TGTTTGGCCC ATTCGTA CTT GACGCTCGCC CACGCCTGAA
541 TTTCTGGTTT CCTATTTAAG AAAGAGGAAA TTTGTTTTGC ATCCCATCTT ATTCAATGTT
601 ACAAACTTAC TCCTATGCCT ATAATCTTGA GCAATATATG GCTTGTCTGTC GT

14.2 Klimatische Rahmenbedingungen

14.2.1.1 Standort Hassel

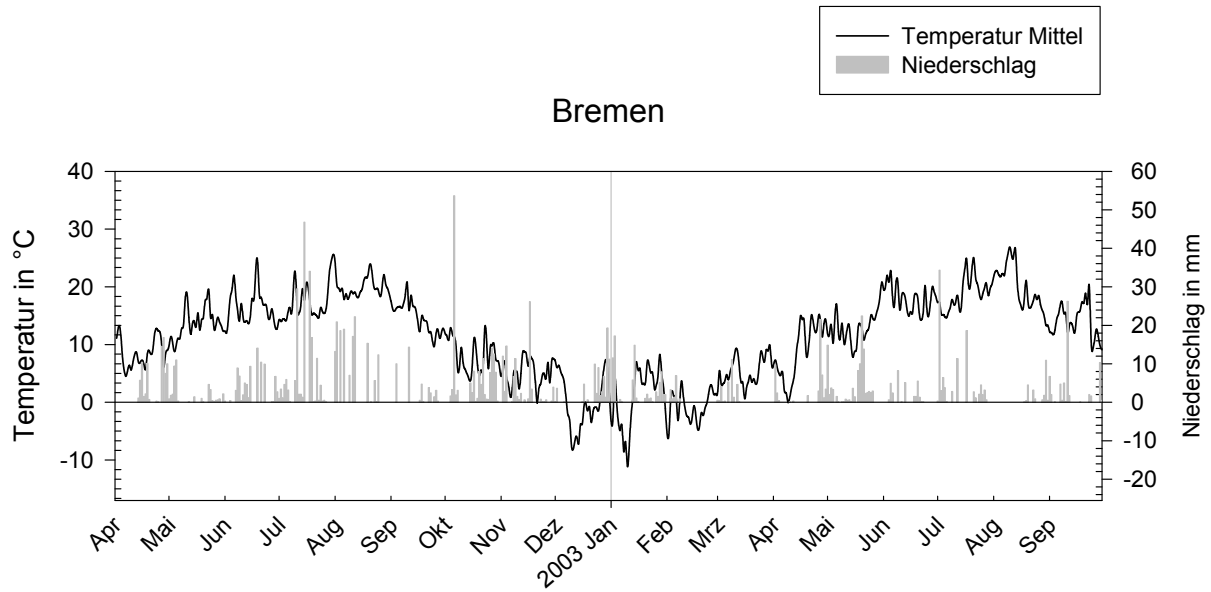


Abb. 37: Tagesmittel und Niederschlag der Messstationen Bremen Flughafen und Verden Dauelsen

14.2.1.2 Standort Hebenshausen

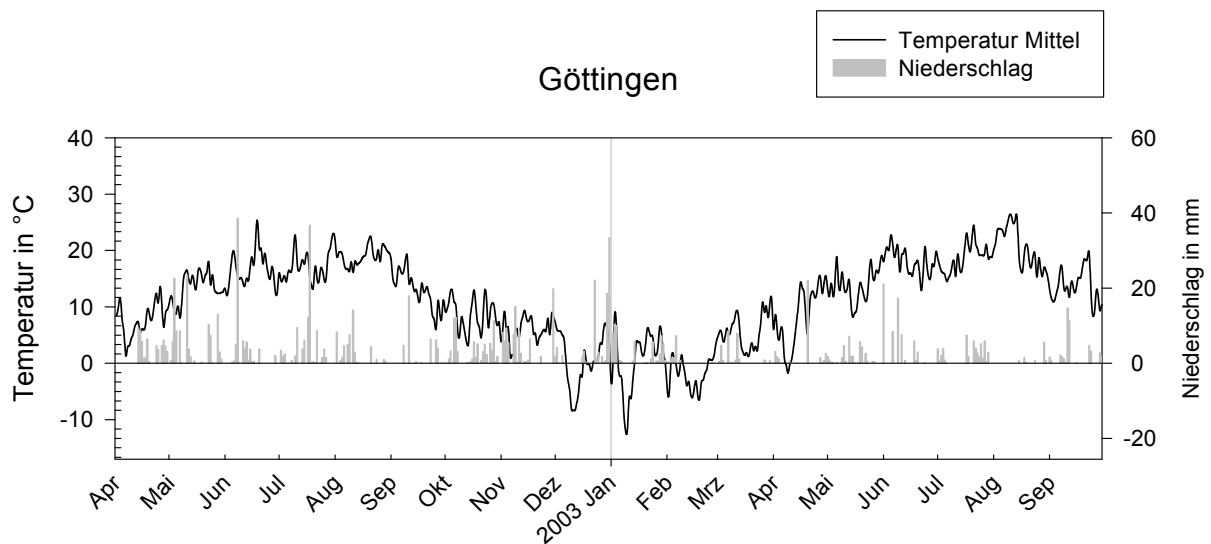


Abb. 38: Tagesmittel und Niederschlag der Messstationen Göttingen und Witzenhausen Ziegenhagen

Tab. 17: Lufttemperatur und Niederschlag im Jahr 2003 im Vergleich zum langjährigen Mittel.

	Lufttemperatur °C Jahresmittel	Niederschlag mm/m ² Jahressumme	Lufttemperatur °C April - Oktober	Niederschlag mm/m ² April - Oktober
langjährig*	8,9	646	13,4	397
2003**	9,2	493	13,9	333

Quelle: * Deutscher Wetterdienst 1961 – 1990, ** LWK Hannover 2003

14.3 Symptomverlauf markierter Pflanzen in Hebenshausen

14.3.1 Standort Hassel

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
1	Anz. FB		6	3	3	2	2	
	Anz. Rot	1	1	2	3	2	1	
	leicht							
	stark				X	X		
	Spitzen						X	
	Stengel				X	X		
	Farbton		hell	dkl.	dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe				4	4	5	
	Schosser					3	3	
2	Anz. FB	4	4	3	1	1	1	
	Anz. Rot	4	4	2	1	1	1	
	leicht							
	stark		X	X	X	X	X	
	Spitzen							
	Stengel		X		X	X	X	
	Farbton						dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe				4	5	7	
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
3	Anz. FB	3	3			3	0	
	Anz. Rot	3	3			0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel		X					
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe					5	6	
	Schosser							
4	Anz. FB	5	3	3	5	3	3	
	Anz. Rot	1	0	0	0	0	0	
	leicht	X						
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
5	Anz. FB	7	4	3	3	4	1	
	Anz. Rot	1	0	1	0	0	1	
	leicht	X		X			X	
	stark							
	Spitzen			X			X	
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
6	Anz. FB	4	4	1	0	0		
	Anz. Rot	4	1	1	0	0		
	leicht			X				
	stark	X						
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		hell	hell				
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
7	Anz. FB	4	3	3	3	3	5	
	Anz. Rot	4	2	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen	X	X					
	gest. Triebe							
	Schosser							
8	Anz. FB	4	4	3	3	3	3	
	Anz. Rot	4	3	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		hell					
	Nekrosen	X						
	gest. Triebe							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
9	Anz. FB		6	5	5	4	6	
	Anz. Rot	1	1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen	X						
	Stengel							
	Farbton		hell					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
10	Anz. FB	7	4	2	1	1	0	
	Anz. Rot	2	4	2	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen	X		X				
	Stengel			X				
	Farbton		hell					
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe				4	5		
	Schosser							
11	Anz. FB		3	3	3	3	3	
	Anz. Rot		1	2	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
12	Anz. FB		5	4	3	4	4	
	Anz. Rot		1	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
13	Anz. FB		3	2	2	1	1	Beny
	Anz. Rot		2	2	2	1	1	
	leicht			X				
	stark				X	X	X	
	Spitzen		X	X				
	Stengel				X			
	Farbton				dkl.	dkl.		
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	10	
	Schosser							
14	Anz. FB		4	3	4	4	5	Beny
	Anz. Rot		2	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen		X					
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
15	Anz. FB		3	2	3	3	4	Beny
	Anz. Rot		2	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen		X	X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
16	Anz. FB		3	0	0	0	0	Beny
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen		X					
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
17	Anz. FB		3	4	3	4	4	Beny
	Anz. Rot		1	2	1	1	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen		X	X	X	X		
	Stengel							
	Farbton		dkl.		hell			
	Nekrosen			X				
	gest. Triebe							
	Schosser							
18	Anz. FB		3	2	1	1	1	Beny
	Anz. Rot		2	1	1	1	0	
	leicht			X				
	stark					X		
	Spitzen			X	X			
	Stengel					X		
	Farbton		hell		dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	1	
	Schosser					1	1	
19	Anz. FB		5	5	4	3	4	
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							
20	Anz. FB		5	3	3	5	4	
	Anz. Rot		2	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
21	Anz. FB		4	1	3	3	6	
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
22	Anz. FB		6	2	3	3	2	Beny
	Anz. Rot		2	2	3	3	0	
	leicht							
	stark			X		X		
	Spitzen			X				
	Stengel				X	X		
	Farbton		hell		dkl.		dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe					6		
	Mosaik							
Schosser					1	4		
23	Anz. FB			5	3	5	6	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
24	Anz. FB			3	3	5	3	
	Anz. Rot			1	0	1	0	
	leicht			X		X		
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
25	Anz. FB			6	6	8	6	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
26	Anz. FB			4	3	3	5	
	Anz. Rot			2	1	2	5	
	leicht					X		
	stark			X				
	Spitzen			X			X	
	Stengel			X			X	
	Farbton				dkl.	dkl.		
	Nekrosen							
	gest. Triebe					3	1	
	Mosaik							
Schosser								
27	Anz. FB			4	2	3	1	
	Anz. Rot			3	0	0	1	
	leicht							
	stark							
	Spitzen			X			X	
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe					2	2	
	Mosaik							
Schosser								
28	Anz. FB			1	4	0	0	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton			hell				
	Nekrosen							
	gest. Triebe					5	6	
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
29	Anz. FB			3	4	4	5	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
30	Anz. FB			4	3	5	3	
	Anz. Rot			2	3	3	1	
	leicht					X		
	stark				X		X	
	Spitzen					X		
	Stengel			X	X			
	Farbton			dkl.	dkl.		dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
31	Anz. FB			2	2	2	0	
	Anz. Rot			2	2	2	0	
	leicht							
	stark				X	X		
	Spitzen							
	Stengel			X	X			
	Farbton			hell	dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	5	
	Mosaik							
	Schosser							
32	Anz. FB			5	5	7	7	Beny
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
33	Anz. FB	5	5	5	5			
	Anz. Rot	2	2	2	1			
	leicht		X	X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton				dkl.			
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
33	Anz. FB			5		7	5	
	Anz. Rot			2		1	0	
	leicht			X		X		
	stark							
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser					1		
34	Anz. FB			3	5	5	6	
	Anz. Rot			3	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
35	Anz. FB				2	5	3	
	Anz. Rot				0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
36	Anz. FB			3	3	0	0	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe					8	12	
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
37	Anz. FB			1	2	3	3	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

14.3.2 Standort Hebenshausen

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
1	Anz. FB		6	3	3	2	2	
	Anz. Rot	1	1	2	3	2	1	
	leicht							
	stark				X	X		
	Spitzen						X	
	Stengel				X	X		
	Farbton		hell	dkl.	dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe				4	4	5	
	Mosaik							
	Schosser					3	3	
2	Anz. FB	4	4	3	1	1	1	
	Anz. Rot	4	4	2	1	1	1	
	leicht							
	stark		X	X	X	X	X	
	Spitzen							
	Stengel		X		X	X	X	
	Farbton						dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe				4	5	7	
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
3	Anz. FB	3	3			3	0	
	Anz. Rot	3	3			0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel		X					
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe					5	6	
	Mosaik							
	Schosser							
4	Anz. FB	5	3	3	5	3	3	
	Anz. Rot	1	0	0	0	0	0	
	leicht	X						
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
5	Anz. FB	7	4	3	3	4	1	
	Anz. Rot	1	0	1	0	0	1	
	leicht	X		X			X	
	stark							
	Spitzen			X			X	
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
6	Anz. FB	4	4	1	0	0		
	Anz. Rot	4	1	1	0	0		
	leicht			X				
	stark	X						
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		hell	hell				
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
7	Anz. FB	4	3	3	3	3	5	
	Anz. Rot	4	2	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen	X	X					
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
8	Anz. FB	4	4	3	3	3	3	
	Anz. Rot	4	3	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		hell					
	Nekrosen	X						
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
9	Anz. FB		6	5	5	4	6	
	Anz. Rot	1	1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen	X						
	Stengel							
	Farbton		hell					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
10	Anz. FB	7	4	2	1	1	0	
	Anz. Rot	2	4	2	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen	X		X				
	Stengel			X				
	Farbton		hell					
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe				4	5		
	Mosaik							
Schosser								
11	Anz. FB		3	3	3	3	3	
	Anz. Rot		1	2	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
12	Anz. FB		5	4	3	4	4	
	Anz. Rot		1	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
13	Anz. FB		3	2	2	1	1	Beny
	Anz. Rot		2	2	2	1	1	
	leicht			X				
	stark				X	X	X	
	Spitzen		X	X				
	Stengel				X			
	Farbton				dkl.	dkl.		
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	10	
	Mosaik							
Schosser								
14	Anz. FB		4	3	4	4	5	Beny
	Anz. Rot		2	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen		X					
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
15	Anz. FB		3	2	3	3	4	Beny
	Anz. Rot		2	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen		X	X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
16	Anz. FB		3	0	0	0	0	Beny
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen		X					
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
17	Anz. FB		3	4	3	4	4	Beny
	Anz. Rot		1	2	1	1	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen		X	X	X	X		
	Stengel							
	Farbton		dkl.		hell			
	Nekrosen			X				
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
18	Anz. FB		3	2	1	1	1	Beny
	Anz. Rot		2	1	1	1	0	
	leicht			X				
	stark					X		
	Spitzen			X	X			
	Stengel					X		
	Farbton		hell		dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	1	
	Mosaik							
Schosser					1	1		
19	Anz. FB		5	5	4	3	4	
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
20	Anz. FB		5	3	3	5	4	
	Anz. Rot		2	1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
21	Anz. FB		4	1	3	3	6	
	Anz. Rot		1	0	0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton		dkl.					
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
22	Anz. FB		6	2	3	3	2	Beny
	Anz. Rot		2	2	3	3	0	
	leicht							
	stark			X		X		
	Spitzen			X				
	Stengel				X	X		
	Farbton		hell		dkl.		dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe					6		
	Mosaik							
Schosser					1	4		
23	Anz. FB			5	3	5	6	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
24	Anz. FB			3	3	5	3	
	Anz. Rot			1	0	1	0	
	leicht			X		X		
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
25	Anz. FB			6	6	8	6	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
Schosser								
26	Anz. FB			4	3	3	5	
	Anz. Rot			2	1	2	5	
	leicht					X		
	stark			X				
	Spitzen			X			X	
	Stengel			X			X	
	Farbton				dkl.	dkl.		
	Nekrosen							
	gest. Triebe					3	1	
	Mosaik							
Schosser								
27	Anz. FB			4	2	3	1	
	Anz. Rot			3	0	0	1	
	leicht							
	stark							
	Spitzen			X			X	
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe					2	2	
	Mosaik							
Schosser								
28	Anz. FB			1	4	0	0	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton			hell				
	Nekrosen							
	gest. Triebe					5	6	
	Mosaik							
Schosser								

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
29	Anz. FB			3	4	4	5	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
30	Anz. FB			4	3	5	3	
	Anz. Rot			2	3	3	1	
	leicht					X		
	stark				X		X	
	Spitzen					X		
	Stengel			X	X			
	Farbton			dkl.	dkl.		dkl.	
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
31	Anz. FB			2	2	2	0	
	Anz. Rot			2	2	2	0	
	leicht							
	stark				X	X		
	Spitzen							
	Stengel			X	X			
	Farbton			hell	dkl.			
	Nekrosen							
	gest. Triebe					4	5	
	Mosaik							
	Schosser							
32	Anz. FB			5	5	7	7	Beny
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
33	Anz. FB	5	5	5	5			
	Anz. Rot	2	2	2	1			
	leicht		X	X				
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton				dkl.			
	Nekrosen				X			
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
33	Anz. FB			5		7	5	
	Anz. Rot			2		1	0	
	leicht			X		X		
	stark							
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser					1		
34	Anz. FB			3	5	5	6	
	Anz. Rot			3	0	0	0	
	leicht			X				
	stark							
	Spitzen			X				
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							
35	Anz. FB				2	5	3	
	Anz. Rot				0	0	0	
	leicht							
	stark							
	Spitzen							
	Stengel							
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
36	Anz. FB			3	3	0	0	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe					8	12	
	Mosaik							
	Schosser							

Nr	Merkmal	16.07.	22.07.	04.08.	25.08.	05.09.	16.09.	Befund
37	Anz. FB			1	2	3	3	
	Anz. Rot			1	0	0	0	
	leicht							
	stark			X				
	Spitzen							
	Stengel			X				
	Farbton							
	Nekrosen							
	gest. Triebe							
	Mosaik							
	Schosser							